



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	魚類ミオシンの構造と機能 : ミオシンのフィラメント形成及び熱変性におけるロッドのドメイン構造の役割
Author(s)	加藤, 早苗
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産学)
Dissertation Number	甲第3460号
Issue Date	1994-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.11501/3076714">https://doi.org/10.11501/3076714</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/51194">https://hdl.handle.net/2115/51194</a>
Type	doctoral thesis
File Information	000000272764.pdf



主論文

魚類ミオシンの構造と機能  
—ミオシンのフィラメント形成及び  
熱変性におけるロツドのドメイン構造の役割—

加藤 早苗

平成 6 年

①

学位論文

魚類ミオシンの構造と機能

—ミオシンのフィラメント形成及び  
熱変性におけるロッドのドメイン構造の役割—

平成6年

北海道大学大学院水産学研究科

水産食品学専攻

加藤早苗

## 略語

本論文では以下の略語を使用した。

- AMPPNP: adenylylimido 5'-diphosphate  
ANS: 8-anilino-1-naphthalene sulfonic acid  
BTEE: N-Benzoyl-L-tyrosine ethyl ester  
CD: circular dichroism  
DEAE: diethylaminoethyl  
DTNB: 5,5'-dithio bis(2-nitrobenzoate)  
DTT: dithiothreitol  
EDC: 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]carbodiimide  
hydrochloride  
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid  
EGTA: ethyleneglycol bis(2-aminoethyl)-N,N'-tetraacetate  
GEE: glycine ethyl ester  
HC: heavy chain component of myosin, S-1 and HMM  
HMM: heavy meromyosin  
kDa: kilodalton  
LC: light chain component of myosin, S-1 and HMM  
LMM: light meromyosin  
PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis  
pCa: negative logarithm of free calcium ion concentration  
PMSF: phenylmethylsulfonyl fluoride  
PPi: pyrophosphate  
rod: myosin rod  
S-1: myosin subfragment-1  
S-2: myosin subfragment-2  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

## 目次

緒言	1
実験材料及び実験方法	
1. 実験材料	4
2. 実験方法	4
(1) 筋原線維の調製	4
(2) ミオシンの調製	4
(3) ミオシンからの S-1 及び HMM の調製法	5
(5) 各種 LMM の調製	6
(6) ミオシン及び rod のキモトリプシン消化生成物の分画	6
(7) ミオシン及び rod のキモトリプシン消化速度の測定	6
(8) $Ca^{2+}$ 濃度の調節	7
(9) ミオシン及びミオシンのキモトリプシン消化生成物のゲル濾過分析	7
(10) rod の粘度測定	7
(11) rod の沈降速度測定	7
(12) rod の $\alpha$ -ヘリックス含量の測定	7
(13) ミオシン、S-1 及び rod のトリプトファン蛍光強度の測定	8
(14) ミオシン、S-1 及び rod 溶液に加えた ANS 蛍光強度の測定	8
(15) rod、各種 LMM のアミノ酸分析	8
(16) ポリアクリルアミドゲル電気泳動	8
(17) 電子顕微鏡観察	9
(18) rod、各種 LMM フィラメント懸濁液の光散乱強度の測定法	9
(19) rod の EDC による化学修飾	9
(20) ATPase 活性の測定	10
(21) 各種タンパク質濃度の測定	11

第1章	コイ・ミオシン分子、特に尾部の分子内構造の解析	12
第1節	キモトリプシン消化法によるコイ・ミオシンの分子内構造解析	13
1.	コイ・ミオシン分子の S-1/rod junction の消化性	
(1)	S-1/rod junction の消化速度の検討	13
(2)	S-1/rod junction の消化性に及ぼす $Ca^{2+}$ の効果	15
2.	コイ・ミオシン rod 内のキモトリプシンによる消化特性	22
第2節	コイ rod の調製とその分子内構造の解析	24
1.	コイ rod の調製法の確立	
(1)	コイ・ミオシンからの rod の調製法	25
(2)	筋原線維を出発材料とした簡便な rod 調製法の開発	29
2.	コイ及びウサギ rod の理化学的性質の比較	
(1)	単量体コイ及びウサギ rod のタンパク質化学的性質の比較	32
(2)	コイ rod のアミノ酸組成	36
(3)	変性剤存在下におけるコイ rod の構造安定性	38
3.	キモトリプシン消化性から検討したコイ rod の内部構造	
(1)	コイ rod のキモトリプシン消化生成物	42
(2)	コイミオシン rod 内の切断部位の同定と、生成物の rod 内配列	49
(3)	各種魚類 rod のキモトリプシン消化性	53
第3節	コイ 40k LMM の単離とその構造特性	
1.	DEAE-Toyopearl による 40k LMM の単離精製	56
2.	40k LMM と 70k LMM 及び rod の理化学的性質の比較	60
第4節	小考察	63

第1節 40k LMM ドメインのフィラメント形成能の特性

1. コイ 40k LMM のフィラメント形成能

(1) コイ 40k LMM の形成する分子集合体の電子顕微鏡観察 71

(2) 40k LMM のフィラメント形成能に及ぼす KCl濃度、pH、Mg<sup>2+</sup>の影響 80

2. ティラピア 39k LMM の単離とそのフィラメント形成能

(1) ティラピア 39k LMM の分離 86

(2) ティラピア 39k LMM の諸性質 89

(3) ティラピア 39k LMM のフィラメント形成能 91

3. ウサギ 36k LMM の単離とフィラメント形成能

(1) ウサギ 36k LMM の生成条件の検討及びその単離 94

(2) ウサギ 36k LMM のフィラメント形成能 100

4. 小考察 105

第2節 化学修飾法による rod の分子内機能解析

1. EDC を用いた rod のカルボキシル基、アミノ基修飾による  
フィラメント形成能の変化 108

(1) カルボキシル基修飾によるコイ rod のフィラメント形成能の変化 109

(2) カルボキシル基修飾によるウサギ rod のフィラメント形成能の変化 120

(3) アミノ基修飾によるコイ rod のフィラメント形成能の変化 125

2. フィラメント形成に関わる rod 分子の表面電荷、Mg<sup>2+</sup>、及び pH の関係

(1) rod のカルボキシル基修飾によるフィラメント形成時の  
Mg<sup>2+</sup>要求性の消失 129

(2) rod のカルボキシル基修飾によるフィラメント形成時の  
pH 依存性の消失 134

3. カルボキシル基修飾したコイ 40k LMM のフィラメント形成能 138

4. 小考察 144

### 第3章 ミオシンの加熱変性時に起きる構造変化

1. 熱変性初期に起こるコイ・ミオシンの凝集反応	148
(1) Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図形の変化から見た コイ・ミオシンの凝集反応	149
(2) 加熱凝集によるミオシンの Ca-ATPase、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性の変化	154
(3) 加熱凝集によるミオシンのフィラメント形成能の変化	159
(4) 加熱凝集によるミオシンの硫安に対する溶解性の変化	162
2. 加熱凝集ミオシンの凝集部位の推定	
(1) 加熱によるミオシンのキモトリプシン消化性の変化	165
(2) 加熱ミオシンのキモトリプシン消化物の Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図	173
3. 加熱時に起こる単離 rod 及び HMM の構造変化	
(1) 加熱時に起こる rod の構造変化	179
(2) 加熱時に起こる HMM の凝集反応	182
4. ウサギ・ミオシンの加熱凝集反応	
(1) 加熱により起こるウサギ・ミオシンの凝集反応	185
(2) ウサギ・ミオシンの加熱によるキモトリプシン消化性の変化	187
5. 小考察	190
総合考察	195
参考文献	203
謝辞	208

## 緒言

魚類筋肉ミオシンの研究は2つの視点から進められてきた。1つは水圏に生息する脊椎動物として、哺乳動物のミオシンとの比較生化学的立場からの研究であり、もう1つは魚を食品として利用するために、魚肉の主要タンパク質であるミオシンの特性を解明し、貯蔵や加工技術に役立てようとする研究である。本研究もこの2面性を有しており、第1、2章では前者の立場で、第3章は主に後者の立場から魚の貯蔵加工において不可避である加熱変性の面から、ミオシンの構造と機能に関する研究を行った。

ミオシンは筋原線維タンパク質重量の約半分を占める主要なタンパク質であり、分子量20万の重鎖（ヘビーチェーン、以下HCと記述する）2本と分子量約2万の軽鎖（ライトチェーン、以下LCと記述する）4本から構成された、分子量48万のヘキサマーである（Woods, 1967）。ミオシンは①ATP分解能、②アクチン結合能、③生理的イオン強度下でのフィラメント形成能という3つの主要な生理機能を有し、生理的な塩濃度下で集合体のフィラメントを形成し、アクチンと結合してATPを分解し、そのとき生ずるエネルギーを用いて筋収縮を起こすと考えられている。このうちATP分解能、アクチン結合能はミオシン分子のうち2つの頭部の部分が、またフィラメント形成能は長い棒状の尾部の部分が担っている。

ミオシンのように巨大な多機能タンパク質の機能部位の研究を行う場合は、プロテアーゼ消化によって小さな機能断片に切断し、単離した各断片を用いる方法がとられている。ウサギミオシンではキモトリプシン感受性の高い部位が分子内に2箇所存在し、それを利用してミオシンの内部構造に関する研究が行われてい

る (Weeds & Pope, 1977)。第1の部位はミオシンの頭部と尾部の結合部分に存在し、ここで切断されると頭部である水溶性のミオシンサブフラグメント-1 (以下 S-1 と記述する) と、尾部を構成する塩溶性のミオシンロッド (以下 rod と記述する) に分割される。rod は更にその中央部付近に存在する第2の部位で切断され、頭部側すなわちアミノ末端側の約半分のミオシンサブフラグメント-2 (以下 S-2 と記述する) と、尾部側すなわちカルボキシル基末端側の半分のライトメロミオシン (以下 LMM と記述する) に分ける事ができる。

魚類ミオシンにおいても、上記のミオシン分子の断片化や各分子断片の持つ機能は似ていると推定されている。特に魚類ミオシン S-1 部分の構造特性は集中的に研究され、ウサギの場合と比較検討されてきた (山本ら, 1989; 浜井ら, 1989; Hamai & Konno, 1990)。その結果、S-1 部分の基本的構造や性質、機能はウサギのものと差がないが、それらの安定性は非常に劣る事が ATP 分解能の消失、すなわち ATPase 活性の失活を指標として明らかにされている。しかし、魚類ミオシンの rod 部分に関しては、ミオシン分子のフィラメント形成能についての研究があるだけで (松浦、新井、1985)、その分子内構造について検討した例や実際にこの部分を取り出して研究した例はほとんどなく、魚類ミオシンの特徴である構造の脆弱性における rod 部分の関与についての研究も少ない。

本研究ではこれまでほとんど研究されていない魚類ミオシンの rod 部分の構造特性を知るため、第1章においてまずコイ・ミオシン中のキモトリプシン切断部位について、特にウサギ・ミオシンで知られる2箇所の部位の切断特性を個々に検討した。その結果、rod 部分の切断部位や分子断片がウサギ・ミオシンとは異なる事を見いだした。そこで、コイ・ミオシンから rod を単離し、そのキモトリプシン消化性を詳細に検討した結果、ウサギ・ミオシンでは知られていない新た

な切断部位が存在している事を発見した。更にこれまで報告されたうちで最も短い LMM を得る事に成功した。第2章では rod が担っている生理機能のフィラメント形成能について知るために、第1章で得られた特殊な LMM のフィラメント形成能を、rod や通常の LMM と比較検討した。そして、rod 内の3つの部分がフィラメント形成および、フィラメント構造の調節といった機能を担っている事、すなわちフィラメント形成は rod 内部で機能分担されている事を明らかにした。第3章においては rod 分子内構造に関する知見をもとにして、ミオシンの加熱変性時に rod 部分で起こる構造変化について検討した。加熱によりミオシンの rod 部分の2次構造である  $\alpha$ -ヘリックス 含量が低下する事が知られており (Samejima, *et al.*, 1974; Rodgers & Harrington, 1987)、魚類ミオシンについてもこの変化を追跡した例がある (丹羽ら, 1985)。それによると、ヘリックス含量の低下は S-1 の変性温度より高温で起こり、そのため魚類ミオシンの rod 部分は安定であり、その構造変化は加熱変性後期に起こると考えられてきた。しかし、本研究で rod 部分での立体構造変化について検討したところ、加熱のごく初期に S-1 部分に変性するのと平行して、rod 部分が凝集する事を見いだした。そのためミオシンの rod 部分の構造は S-1 と同じくらい不安定であると考え、更にミオシンの凝集変性の機構についても考察した。

このように、本研究はコイミオシン分子の内部構造と機能の関係、更にこの構造安定性に関して総合的に理解することを目的とした。また、それらの結果をウサギミオシンの場合と比較検討し、ミオシン分子が普遍的に持つ構造と機能の関係や、魚類ミオシンの特殊性を明らかにしようとした。

## 実験材料及び実験方法

### 1. 実験材料

筋原線維、ミオシンは以下の魚類の筋肉を用いて調製した。すなわち、即殺直後のコイ (*Cyprinus carpio*) 及び ヒラメ (*Parelichthys abivaceus*)、また氷冷した マサバ (*Scomber japonicus*) 及び ハマチ (*Seriola quinqueradiata*)、冷凍 クロマグロ (*Thunnus thynnus*) の背肉を用いた。ティラピア (*Tilapia mossambica*) の背肉は 5 % ソルビトールを加え  $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結したものを使用した。対照として、ウサギ (*Oryctolagus cuniculus*) 背筋も用いたが、これは即殺後の背肉をミンチにし、50 % グリセリン中で  $-20^{\circ}\text{C}$  に貯蔵しておいたもの、もしくは 5 % ソルビトールを加え  $-40^{\circ}\text{C}$  で凍結しておいたものを使用した。

### 2. 実験方法

#### (1) 筋原線維の調製

筋原線維は加藤らの方法 (加藤ら、1977) に準じて調製した。

#### (2) ミオシンの調製

ミオシンは、Makie & Connel (1964) の方法に準じて調製した。すなわち、ひき肉から ATP を含む 0.45 M KCl (pH 6.4) 溶液で、アクチンを多少含む粗ミオシンを抽出した後、碓谷ら (1981) の硫酸分画法 (40-55 % 飽和) を用いてアクチンを除き精製した。

また、熱変性の実験に用いたミオシンは小関ら（1993）の方法によって筋原線維から直接調製した。即ち、筋原線維を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解後、5 mM ATP-Mg 存在下で硫酸分画（40-50 % 飽和）してミオシンを調製した。

### (3) ミオシンからの S-1 及び HMM の調製法

Weeds and Pope (1977) の変法に従い、S-1 調製のためにはミオシン (0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM DTT) を 1 mM EDTA 存在下で、また HMM 調製のためにはミオシン (0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT) を 1 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下でキモトリプシン消化した。消化反応を 1 mM PMSF を添加して停止させた後、超遠心分離し、得られた水溶性画分に含まれる S-1 あるいは HMM を Sephacryl S-300 ゲル濾過により精製して使用した。

### (4) rod の調製

コイ及びウサギ rod は、ミオシン (0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM DTT) を 1 mM EDTA 存在下でキモトリプシン消化後、消化物に含まれる塩溶性画分 (粗 rod) を DEAE-Toyopearl イオン交換クロマトグラフィーに供し、混在しているミオシンや少量の LMM を除き精製した。また、大量の rod を調製する場合、もしくは各種魚類の rod を調製する場合には、ミオシンの代わりに筋原線維を出発材料とした簡便法を用いた。即ち、筋原線維をミオシンの消化の場合と同じ条件でキモトリプシン消化した後、遠心分離して沈澱に回収した。沈澱を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解後、硫酸分画 (40-55% 飽和) によって rod を調製した。詳細は結果の項で述べる。

#### (5) 各種 LMM の調製

コイ各種 LMM 及びウサギ LMM は rod (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) をキモトリプシン消化後、消化物に含まれる塩溶性画分を DEAE-TOYOPEARL イオン交換クロマトグラフィーに供して、分離精製した。詳細は結果の項で述べる。

#### (6) ミオシン及び rod のキモトリプシン消化生成物の分画

ミオシンや rod を消化した際に生成される水溶性及び塩溶性両画分への分画は以下の様に行った。すなわち、消化物を 0.05 M KCl (pH 7.0)、あるいは 5 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.05 M KCl (pH 7.0 あるいは 6.5) 溶液に透析あるいは希釈後、超遠心分離 (80,000 x g、60 分) し、上清を水溶性画分、沈澱を塩溶性画分とした。

#### (7) ミオシン及び rod のキモトリプシン消化速度の測定

ミオシン及び rod のキモトリプシン消化速度は、ミオシン重鎖 (HC) 及び rod のサブユニット (130 kDa) の消失速度を指標として求めた。すなわち、消化物を SDS-PAGE で分析した後、これらの残存量をデンストメトリー法で分析し、その経時的減少を、一次反応式に従い解析して、その速度定数 (k) を算出した。また、ミオシンからの S-1 と HMM の生成量は、ミオシン消化物あるいはその水溶性画分を SDS-PAGE に供し、それぞれの HC (S-1 HC、HMM HC) 量をデンストメトリーで定量してその指標とした。なお、異なった条件でミオシンや rod のキモトリプシン消化を行う場合は、予め BTEE を基質として、各条件下におけるキモトリプシンの活性値を求めた。

(8)  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の調節

ミオシンのキモトリプシン消化を低濃度域の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で行う場合は Ca-EGTA buffer を用いて調節した。なお、Ca-EGTA 複合体の pH 7.0 での安定度定数は  $2.5 \times 10^6$  ( $\text{M}^{-1}$ ) を用いた (Harafuji & Ogawa, 1980)。

(9) ミオシン及びミオシンのキモトリプシン消化生成物のゲル濾過分析

S-1 あるいは HMM のゲル濾過は 0.1 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液で平衡化した Sephacryl S-300 カラムを用いて行った。またミオシン、rod、HMM、および LMM 画分のゲル濾過は、0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液で平衡化した Sepharose CL-4B カラムを用いて行った。

(10) rod の粘度測定

rod の粘度測定は 2 ml 容量のオストワルド型粘度計を使用し、0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) の条件で、20°C で行った。

(11) rod の沈降速度測定

rod の沈降速度は、0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) の条件下、5°C において、シュリーレン光学系を併置した Beckman L2-65P 型超遠心分離機を使用して測定した。

(12) rod の  $\alpha$ -ヘリックス含量の測定

rod の  $\alpha$ -ヘリックス含量 (H) は、タンパク濃度 0.3~0.8 (mg/ml)、0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) における CD スペクトルの測定によって求めた。

測定は日本分光社製 円偏光二色性分散計 J-600型 を使用し、222nm及び208nm の分子橢円率 ( $[\theta]$ ) から次式を用いて求めた (Greenfield & Fasman, 1969)。

$$H = [\theta]_{222\text{nm}} / -40000$$

$$H = [\theta]_{208\text{nm}} - (-4000) / (-33000) - (-4000)$$

(13) ミオシン、S-1 及び rod のトリプトファン蛍光強度の測定

ミオシン、S-1 及び rod のトリプトファン残基由来の蛍光強度は、295nm で励起し、340nm で測定した (Duke et al, 1966; Seidel, 1975)。

(14) ミオシン、S-1 及び rod 溶液に加えた ANS 蛍光強度の測定

尿素あるいは塩酸グアニジンを添加した時の、ミオシン、S-1 及び rod の構造変化を、ANS の蛍光強度変化から測定した。タンパク質溶液に 80  $\mu\text{M}$  ANS を加え、400nm で励起し、480nm での蛍光強度を、島津蛍光光度計 RF-500 を用い、20°C で測定した (Duke et al, 1966; Cheung & Morales, 1969)。

(15) rod、各種 LMM のアミノ酸分析

アミノ酸分析は凍結乾燥した rod 及び各種 LMM をメタンスルホン酸水解した後、アミノ酸自動分析機 (日立 835 型) を用いて行った。

(16) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、0.1% SDS を含む 10% あるいは 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて、Laemmli & Farve (1973) の

方法に準じて行った。各フラグメントの定量は、それらのバンドのクーマシーブルー R-250 による染色強度をデンストメーターで測定する事により行った。

EDC 架橋した rod の SDS-PAGE は 0.5 % アガロースを含む 2.7 % ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

尿素ゲル電気泳動は 8 M 尿素を含む、4 % ポリアクリルアミドゲルを用いて行った。

等電点電気泳動 (IEF) は 8 M 尿素、2 % Ampholin (pH 3-10.5) を含む、3.9 % ポリアクリルアミドゲルを用い、電極液は 0.02 M NaOH と 0.01 M  $H_3PO_4$  を使用した。

#### (17) 電子顕微鏡観察

ミオシン、rod 及び各種 LMM の形成するフィラメントの電子顕微鏡による観察は Huxley (1963) の方法に従って行った。即ち、コロジオン支持膜に炭素蒸着して補強したシートメッシュ上にサンプルをのせ、1 % あるいは 2 % 酢酸ウランを用いてネガティブ染色した後、日立電子顕微鏡 H-7000 を用い、加速電圧 75 kV で観察した。

#### (18) rod、各種 LMM フィラメント懸濁液の光散乱強度の測定法

rod 及び各種 LMM のフィラメント懸濁液 (タンパク質濃度 0.2 mg/ml) の組成は図の説明文中に示した。光散乱強度は 350 nm における 90° 方向の散乱光を島津蛍光光度計 RF-5000 を用いて 20°C で測定した。

(19) rod の EDC による化学修飾

rod の EDC による化学修飾反応はタンパク質濃度 1 mg/ml で、0.5 M KCl、20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) 溶液中で行った。カルボキシル基修飾の場合は 0.4 M グリシンエチルエステル 共存下で、また アミノ基 修飾の場合は 0.2 M HCOONa 共存下で種々濃度の EDC を添加し、コイ rod の場合は 20°C で 2 時間、ウサギ rod の場合は 25°C で 1 時間反応させた後、10 mM 2-メルカプトエタノールの添加により反応停止した。

(20) ATPase 活性の測定

ミオシン及び、S-1 の ATPase 活性測定の反応組成は各図の説明文中に示した。ミオシン及びそのキモトリプシン消化物のゲル濾過により溶出したフラクションの各種 ATPase 活性は次のように測定した。即ち、Ca-ATPase 活性の反応組成は 0.5 M KCl、25 mM Tris-maleate (pH 7.0)、5 mM CaCl<sub>2</sub>、1 mM ATP とし、また K-EDTA-ATPase 活性の場合は 0.5 M KCl、25 mM Tris-maleate (pH 7.0)、5 mM EDTA、1 mM ATP とした。さらに、アクチン 活性化 Mg-ATPase 活性 の場合は 0.053 M KCl、25 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、1 mM ATP、0.057 mg/ml rabbit actin とした。これら反応混液中に一定容量のフラクション溶液を添加して活性を測定した。いずれの場合も、反応は終濃度 5% の過塩素酸で停止させ、生成した無機リン酸を Gomori (1942) 法を用いて定量した。尚、ゲル濾過により溶出したフラクションの ATPase 活性の単位は  $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{ml}$  で表した。

(21) 各種タンパク質濃度の測定

タンパク濃度の測定はビュレット法 (Gornall *et al.*, 1949)、マイクロビュレット法 (Itzhaki & Gill, 1964) 及び Lowry (1951) らの方法を併用し、いずれの場合も牛血清アルブミン画分 V を標準として比色定量した。 $\alpha$ -キモトリプシン及びトリプシン濃度は、それぞれ  $E_{282\text{nm}}^{1\%} = 20.4$  及び  $E_{280\text{nm}}^{1\%} = 15.4$  を用いた紫外吸収法で決定した。

## 第1章 コイ・ミオシン分子、特に尾部の分子内構造の解析

本章では魚類ミオシンの分子内構造をウサギのそれと比較検討する事を目的とし、キモトリプシン消化性を指標として研究した。

既にウサギ・ミオシンではキモトリプシンによる切断部位が2箇所あり、それぞれの部位の消化特性が明らかにされている (Weeds & Pope, 1977)。すなわち第1の部位である S-1 と rod の接合部 (S-1/rod junction と呼ぶ) は2価金属イオン (特に  $\text{Ca}^{2+}$ ) 存在下では切断を受けないが、EDTA などのキレート剤存在下ではこの部位の近傍にある DTNB-LC から結合  $\text{Ca}^{2+}$  が除かれると切断されるようになる。また、HMM/LMM junction と呼ばれる第2の部位は rod の中央部に存在し、ミオシンがフィラメントを形成している状態ではこの部位は立体的に保護されて切断され難いが、単量体の状態では切断されるようになる。

そこでウサギ・ミオシンで知られているこのような切断部位及び消化生成物がコイ・ミオシンにも共通して見られるのか否かを詳細に検討した。特にこれまでほとんど研究されていない魚類ミオシンの尾部に注目して調べ、単離した rod の内部構造についてもウサギのそれと比較検討した。

## 第1節 キモトリプシン消化法によるコイ・ミオシンの分子内構造解析

### 1. コイ・ミオシン分子の S-1/rod junction の消化性

#### (1) S-1/rod junction の消化速度の検討

まずコイミオシンのキモトリプシン消化速度をウサギミオシンのそれと比較検討した。コイおよびウサギのミオシンを 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM EDTA、0.1 mM DTT 溶液に懸濁し、キモトリプシンを用いて消化した。消化物の SDS-PAGE 図によりミオシン HC 残存量を求め、その経時変化を一次反応様式に従って解析し、ミオシン HC 消失速度定数 ( $k$ ) を求めた。次いで、各消化温度 (10~20°C) における  $k$  とキモトリプシン量の関係を Fig. 1 に示した。その結果、同じ条件下ではコイ・ミオシンの方が2.5~3倍消化速度は大きく、S-1/rod junction のキモトリプシン感受性はコイミオシンの方が大きかった。換言すると、コイ・ミオシンを用いてウサギ・ミオシンと同程度の消化速度を得るためには、消化温度を 5~10°C 程低温にするか、もしくはキモトリプシン量を 30~40 % に減少する必要がある。

この結果を参考にして、以下の実験では、コイ及びウサギ・ミオシンでほぼ同じ消化速度が得られるように、コイ・ミオシンの場合には 1/250 (w/w) のキモトリプシンを用い 20°C で、またウサギ・ミオシンの場合には 1/250 (w/w) あるいは 1/100 (w/w) のキモトリプシンを用い 25°C で消化を行うことにした。

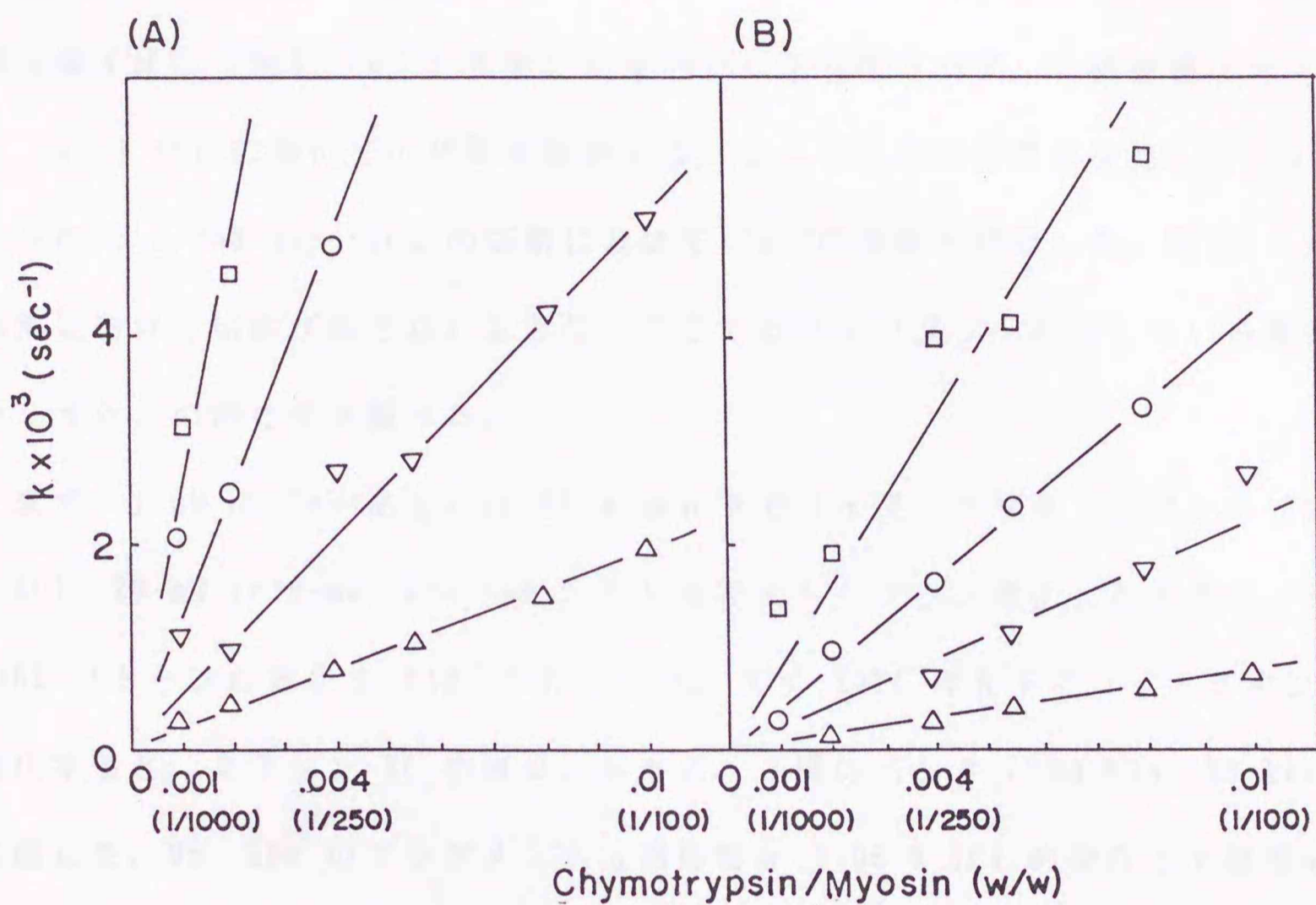


Fig. 1. Chymolytic digestibility of carp and rabbit myosins.

Myosin isolated from carp (A) and rabbit (B) (0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA) was digested by  $\alpha$ -chymotrypsin. The amount of chymotrypsin was varied from 1/1000 to 1/100 by weight relative to myosin. The digestion was carried out at 10 °C ( $\Delta$ ), 20 °C ( $\nabla$ ), 25 °C ( $\circ$ ), and 30 °C ( $\square$ ). The myosin heavy chain (HC) remained undigested was estimated by SDS-PAGE and densitometry and the first order disappearing rate ( $k$ ) of myosin HC band was calculated.

(2) S-1/rod junction の消化性に及ぼす  $\text{Ca}^{2+}$  の効果

ウサギ・ミオシンの S-1/rod junction のキモトリプシン消化性には 2 価金属イオンが大きく影響する事が知られている。この部分は EDTA 存在下すなわち 2 価金属イオン（特に  $\text{Ca}^{2+}$ ）を除いた条件でしか切断されず、2 価金属イオン（特に  $\text{Ca}^{2+}$ ）はこの部位での切断を阻害する。ここではこの性質に注目し、コイミオシンの S-1/rod junction の切断に及ぼす  $\text{Ca}^{2+}$  の効果を検討した。なお、rod 内部における切断が起きないように、ここではフィラメント形成している条件でのミオシンの消化性を調べた。

まず、1 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  あるいは EDTA 存在下でコイ及びウサギ・ミオシン（0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)）をキモトリプシン消化したときの、SDS-PAGE パターンの変化を Fig. 2 に示した。まず EDTA 存在下でコイ・ミオシンを消化すると、ミオシン HC の減少とともに、2 種のバンド（130 kDa、95 kDa）が生成した。95 kDa のフラグメントは消化物を 0.05 M KCl の条件下で超遠心分離して得た上澄の水溶性画分中に回収され、すでに報告されているコイ S-1 HC バンドであった（碓谷ら、1981）。一方、沈殿画分に検出された 130 kDa のバンドは塩溶性の rod のサブユニットと推定された。これら EDTA 存在下での消化生成物はウサギ・ミオシンからの生成物と共通していた。

次に  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で消化した場合を見ると、ウサギ・ミオシンは EDTA 存在下に比べて消化速度は 1/4 に低下し、非常に消化を受け難くなっていた。なお、キモトリプシン活性（BTEE 基質）は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でむしろ約 1.4 倍高くなるので、消化性が低下するのは  $\text{Ca}^{2+}$  によって酵素活性が低下したためではない。更に S-1 と rod に替わり HMM（150 kDa 付近）と塩溶性の LMM（70~60 kDa 付近のバ

ンドがそれに相当する)が生成した。

一方、コイ・ミオシンの  $\text{Ca}^{2+}$ 存在下の消化パターンはウサギの場合とは多少異なり、消化物中に rod (130 kDa) と S-1 (95 kDa) が検出され、EDTA 存在下の消化生成物と共通した成分がこの条件でも生成する事が判った。事実、この消化物の水溶性画分中には HMM の他に S-1 も含まれていた。



Fig. 2. Change in SDS-PAGE pattern of myosin during chymotryptic digestion.

Myosin from carp and rabbit (0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.1 mM DTT) was digested by chymotrypsin in the presence of either 1 mM EDTA or 1 mM  $\text{CaCl}_2$ . The digestion was carried out by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C for carp myosin, and 1/100 (w/w) of chymotrypsin at 25 °C for rabbit myosin. After termination of the reaction with 1 mM PMSF, the digests were centrifuged at 80,000 x g for 60 min, and the supernatant obtained (s) was shown as water-soluble fraction. SDS-PAGE was conducted using 12.5% polyacrylamide gel. MHC, Al, A2, DTNB are myosin heavy chain, alkali light chain 1, alkali light chain 2 and DTNB-light chain, respectively. HMM HC and S1 HC are heavy chains of heavy meromyosin and subfragment-1, respectively. A, carp; B, rabbit; (E), digestion in the presence of 1 mM EDTA; (Ca), digestion in the presence of 1 mM  $\text{CaCl}_2$ .

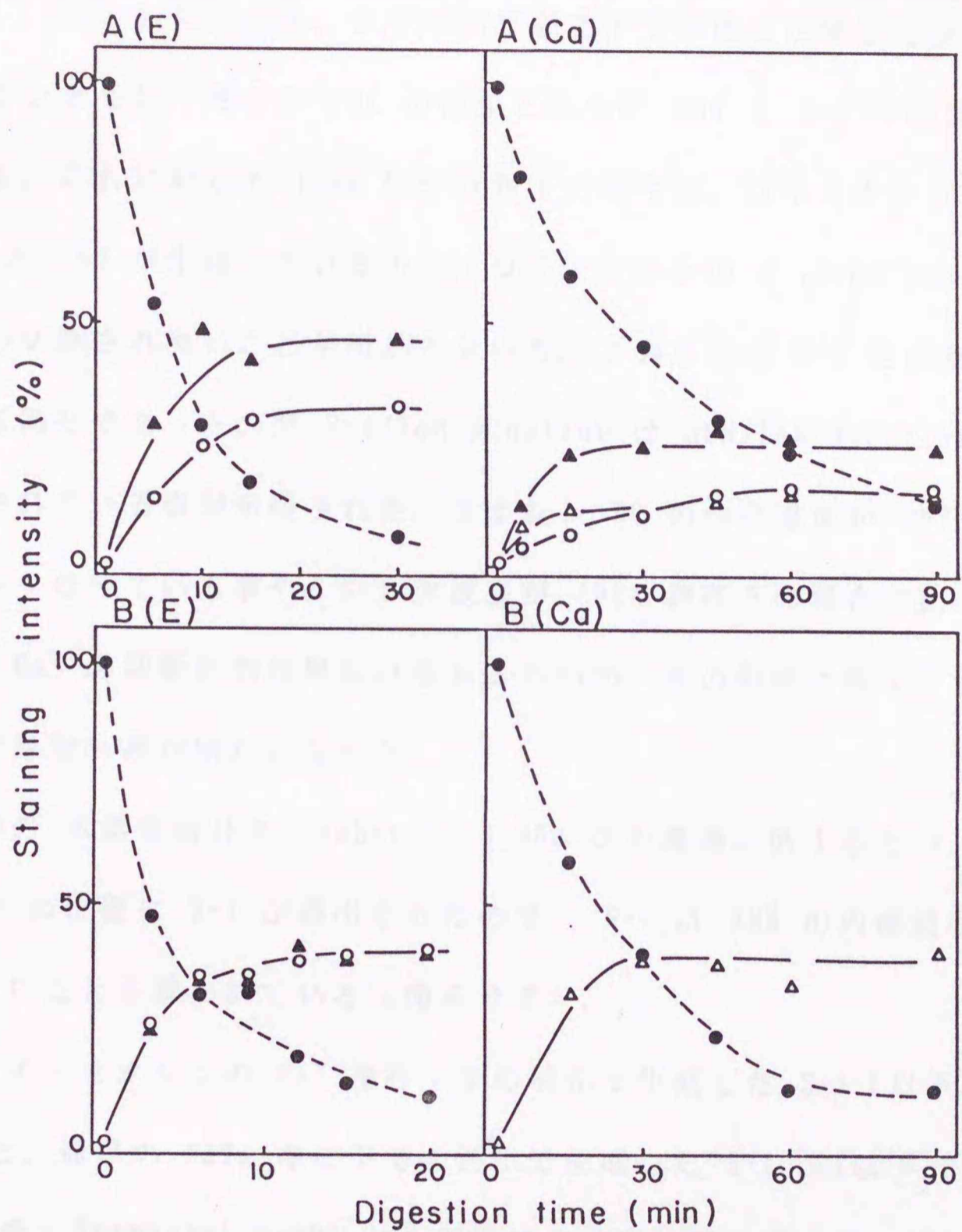


Fig. 3. Time course of S-1, rod and HMM production during chymotryptic digestion of myosin.

The amount of myosin undigested (●), S-1 (○), rod (▲) and HMM (Δ) produced was estimated from the staining intensity of heavy chains of myosin, HMM, and S-1 as shown in Fig. 2. A, carp; B, rabbit; (E), digestion in the presence of 1 mM EDTA; (Ca), digestion in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub>.

これらの SDS-PAGE 図上の各バンドの染色強度をデンストメトリーにより定量し、各フラグメントの生成量を消化前のミオシン HC 量を100とした場合の相対値で表し、Fig. 3 に示した。まず EDTA 存在下で消化した場合にはコイ、ウサギ両ミオシンともに、ミオシンHC の減少とともに rod と S-1 がほぼ平行して生成していた。これに対して 1 mM  $Ca^{2+}$ 存在下の場合は、コイミオシンの消化初期から S-1 と rod が生成しているため、コイミオシンの S-1/rod junction はこの条件でも切断され易いことが明かとなった。このときの S-1 生成量は HMM 生成量とほぼ同じであったので S-1/rod junction は HMM/LMM junction と同じくらい切断されている事が示唆された。ミオシン HC の消化速度が EDTA 存在下よりやや小さくなっている事や、S-1 生成量が EDTA 存在下の場合に比べると少ない事から、 $Ca^{2+}$ の切断抑制効果はみられるものの、その効果は弱く、切断を完全に抑制できない事が明かとなった。

消化物の水溶性画分を Sephacryl S-300 ゲル濾過に供すると  $V_0$  に HMMが、 $V/V_0=1.8$  の位置に S-1 が溶出されたので、S-1 は HMM の内部開裂による生成物ではないことを確かめている (図示せず)。

次にコイ・ミオシンの  $Ca^{2+}$ 存在下での消化で生成した S-1 (以下、S-1(Ca) と略す) と、通常の EDTA 存在下での消化で生成した S-1 ((以下 S-1(E) と略す) を比較した。Sephacryl S-300 ゲル濾過での溶出位置は同一で、SDS-PAGE におけるサブユニット組成も同じで、いずれも、95 kDa の HC と2種のアリカリ軽鎖から成っており、DTNB 軽鎖は検出されなかった。また両 S-1 をトリプシン消化すると、いずれの S-1 HC も 3 つの内部断片 (27 kDa、50 kDa、20 kDa フラグメント) に切断され、生成速度にも違いは認められなかった。そのため、両 S-1 の内部構造はほぼ同一であると考えた (図示せず)。

次に両 S-1 の生化学的性質について比較し、Table 1 にまとめて示した。それによると、両 S-1 の間には Ca-ATPase と EDTA-ATPase 比活性にほとんど差は認められなかった。また、両 S-1 に種々濃度のウサギアクチンを加えて、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性を測定した結果、最大活性及び S-1 とアクチンの見かけの親和力ともに差は認められないと判断した。さらに、両 S-1 (0.1 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) の 30°C での加熱変性様式についても検討したが、Ca-ATPase 失活速度並びに、変性に伴って生じる濁度にも差はなかった。以上の結果より、S-1(Ca) と、S-1(E) は、その構造、酵素活性、アクチンとの相互作用、Ca-ATPase の熱変性様式に差は認められず、同一のものであると結論した。

以上のことから、コイ・ミオシンの S-1/rod junction の切断は 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも阻止されず、この切断によって EDTA 存在下の消化で生成する S-1 と同じ S-1 が生成すると結論した。

Table 1

Comparison of the biochemical properties of S-1(Ca) and S-1(E) preparations

	S-1(Ca)* <sup>1</sup>	S-1(E)* <sup>1</sup>
Ca-ATPase* <sup>2</sup> ( $\mu$ mol Pi/min·mg)	0.37	0.35
K-EDTA-ATPase* <sup>3</sup> ( $\mu$ mol Pi/min·mg)	2.83	3.58
Actin-activated Mg-ATPase		
Ka(mg/ml actin)* <sup>4</sup>	4	4
Vmax( $\mu$ mol Pi/min·mg)	40	40
heat-inactivation rate constant* <sup>5</sup> (s <sup>-1</sup> )	40.8x10 <sup>-5</sup>	37.1x10 <sup>-5</sup>

\*<sup>1</sup> S-1(Ca) and S-1(E) were prepared as in Fig. 2.

\*<sup>2</sup> ATPase activity was assayed in 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM CaCl<sub>2</sub> and 1 mM ATP at 25 °C.

\*<sup>3</sup> ATPase activity was assayed in 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 5 mM EDTA and 1 mM ATP at 25 °C.

\*<sup>4</sup> Ka (apparent dissociation constant for S-1 and actin complex) and Vmax (maximum activity) were calculated from double-reciprocal plots of activity and actin concentration (Eisenberg & Moos, 1970).

\*<sup>5</sup> Inactivation rates of Ca-ATPase activity of S-1 heated at 30 °C were estimated.

ここまでは  $\text{Ca}^{2+}$  の効果を 1 mM に限定して検討してきたが、コイ・ミオシンの場合は  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が不十分である可能性も考えられた。そこで、S-1 の生成量の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性を、コイ及びウサギ・ミオシンで比較した。Fig. 2 と同じ条件で種々濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で消化を行い、SDS-PAGE 図に検出される S-1 HC 及び HMM HC のバンドの染色強度から生成量を求め、Fig. 4 に示した。コイ・ミオシンにおいては、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が  $1 \times 10^{-5}$  M (pCa 5) 以上になると S-1 の生成量は急激に低下し、pCa 3.5 (0.3 mM) で最小値を示したまま pCa 3 (1 mM) までほとんど変わらなかった。この時の S-1 の生成量は EGTA 存在下の場合の約 30% 程度であった。一方 HMM 生成量は S-1 の生成と対応するような、逆の  $\text{Ca}^{2+}$  依存性を示した。すなわち、HMM は pCa 5.0 すなわち  $1 \times 10^{-5}$  M 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度下で生成するようになり、pCa 3.5 (0.3 mM) で最大生成量に達した。このことから、S-1 生成量を最小限に抑えるためには 0.3 mM 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  があれば十分であると判った。しかし、それでも S-1 は HMM とほぼ同量生成していたので、コイ・ミオシンでは十分な濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも S-1/rod junction の切断が起こると結論した。

一方、ウサギ・ミオシンの場合を見ると、S-1 生成量は pCa 7.5 すなわち  $3 \times 10^{-8}$  M 以上の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度で減少し始め、pCa 5 ( $1 \times 10^{-5}$  M) ではほとんど生成しなくなった。そして HMM の生成は S-1 の生成量減少と対応するように起こった。S-1 生成量が最大値の 1/2 を示す時の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度をコイとウサギで比較すると、コイでは pCa=4.3 であるのに対し、ウサギ・ミオシンの場合は pCa=6.3 であった。

以上の結果から、コイ・ミオシンの S-1/rod junction の切断を抑制するためには、ウサギ・ミオシンにおける必要量の約 100 倍という、かなり高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$

を必要とすること、しかも十分な  $\text{Ca}^{2+}$  濃度であっても、キモトリプシンによる S-1/rod junction の切断を完全には抑制できないことが明らかとなった。このことから、コイ・ミオシン分子の S-1/rod 結合部分はウサギミオシンに比べて脆弱な構造をしているものと結論した。

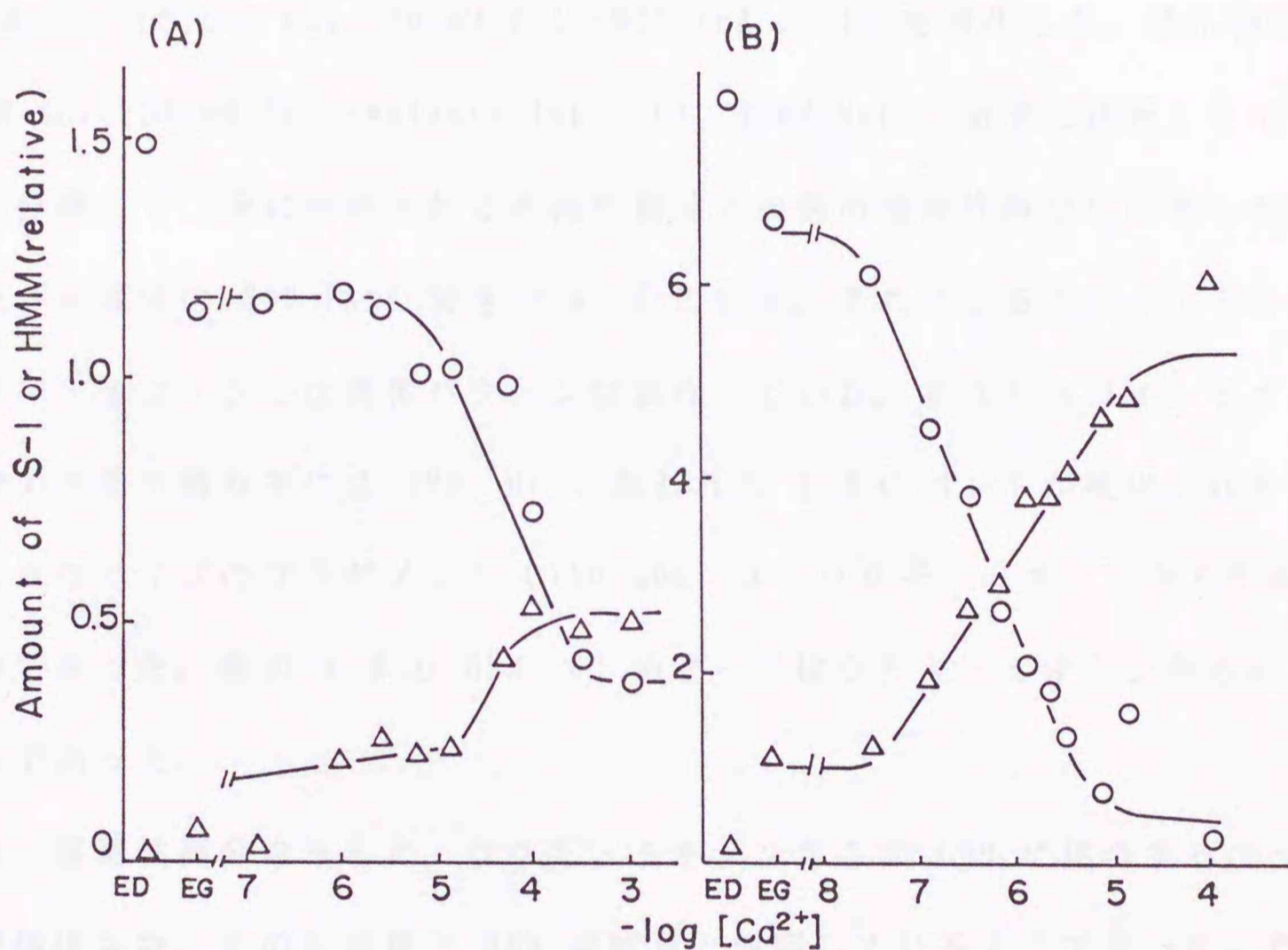


Fig. 4 . Effect of free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration on the productivity of S-1 and HMM.

Myosin from carp (A) and rabbit (B) was digested in the same medium as described in Fig. 2, except that free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration was varied by using Ca-EGTA buffer, and that digestion period was 30 min. ED and EG denote the digestion in the presence of 1 mM EDTA and 1 mM EGTA, respectively. The used stability constant for Ca-EGTA at pH 7.0 was  $2.5 \times 10^6$  ( $\text{M}^{-1}$ ) (Harafuji & Ogawa, 1980). The amount of S-1 and HMM produced was calculated from the staining intensity of S-1 heavy chain (○) and HMM heavy chain (△). (A), carp; (B), rabbit.

## 2. コイ・ミオシン rod 内のキモトリプシンによる消化特性

次にコイ・ミオシンの rod 部内のキモトリプシン切断特性を知るため、単量体状態のコイ及びウサギ・ミオシンの消化性を比較検討した。その際、S-1/rod junction で切断が起こると断片の組成が複雑になるので、1 mM  $\text{CaCl}_2$  存在下で両ミオシン (0.5 M  $\text{KCl}$ 、20 mM  $\text{Tris-HCl}$  (pH 7.5)) を消化した。消化物は 0.05 M  $\text{KCl}$ 、20 mM  $\text{Tris-maleate}$  (pH 7.0)、5 mM  $\text{MgCl}_2$  溶液に透析したのち、超遠心分離して上澄に回収される水溶性画分と沈澱の塩溶性画分に分画した。消化物及び両画分の SDS-PAGE 図を Fig. 5 に示す。それによるとコイ・ミオシンとウサギ・ミオシンでは消化パターンは異なっていた。すなわちコイ・ミオシン消化物の水溶性画分中には HMM HC と思われる 3 本のバンドが検出されたが、最も大きなサイズのフラグメント (170 kDa) は、ウサギ・ミオシンから生成しないものであった。他の 2 本の HMM HC のサイズはウサギ・ミオシンからのものと同じであった。

一方、塩溶性画分をみると、ウサギ・ミオシンからは LMM に相当するフラグメントが検出され、その生成量は HMM 生成量と対応しているようであった。これに対し、コイ・ミオシンの場合はウサギ・ミオシンの LMM と似たサイズの生成物は認められるものの、その量はかなり少なかった。また、この他に、より低分子量のフラグメント (40 kDa) も塩溶性画分中に含まれていた。このような小さいサイズの生成物はウサギ・ミオシンからは認められなかった。

以上、コイ・ミオシンからは特殊なキモトリプシン消化断片、すなわちウサギ HMM HC より長い HMM 様フラグメントと通常の LMM より短い塩溶性フラグメント

が生成した。よって、コイ・ミオシン rod 内部にはこのような特殊なフラグメントを生成させるような、特殊な消化部位が存在する事が示唆され、そのために rod 内部のキモトリプシン消化性がウサギ・ミオシンとは異なると推測した。

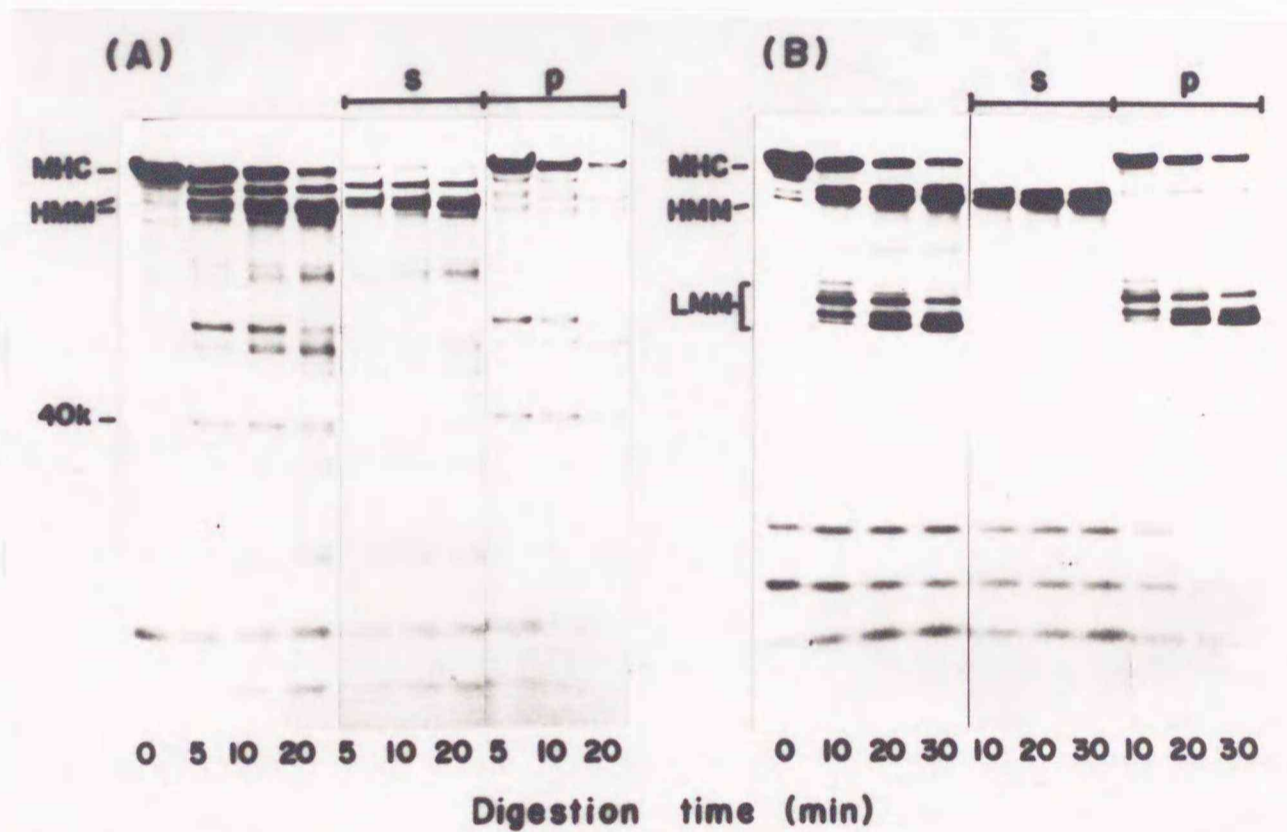


Fig. 5. SDS-PAGE pattern of chymotryptic digests of monomeric myosin.

Myosin from carp (A) and rabbit (B) in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 0.1 mM DTT was digested by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C in the presence of 1 mM CaCl<sub>2</sub>. After termination of the digestion with 1 mM PMSF, the digest was dialyzed against 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and centrifuged at 80,000 x g for 60 min; (s) and (p) show the supernatant and the precipitate, respectively. MHC and HMM are the same as in Fig. 2. LMM and 40k are light meromyosin and 40 kDa fragment produced, respectively.

## 第2節 コイ rod の調製とその分子内構造の解析

### 1. コイ rod の調製法の確立

コイ・ミオシンのキモトリプシン消化性から、ウサギと異なる切断部位が rod 部分に存在することが推測された。そこで、コイ・ミオシンの rod 部分の内部構造についてより詳細な検討が必要と考え、ミオシンから rod を調製し、それを用いて実験を行った。

まず、コイ・ミオシンからの rod の調製方法について検討した。第1節の結果から、EDTA を含む低イオン強度溶液中でキモトリプシン消化をすれば、ウサギ・ミオシンと同様にコイ・ミオシンでも S-1 と rod に限定分解できることが判った。この消化物中の S-1 は水溶性なので低イオン強度下での遠心分離によって上澄部に分離できるが、沈澱画分には rod の他に未消化のミオシンや他の分子断片 (LMM) が混入することが予想された。従来のウサギ・ミオシンからの rod 調製法では、未消化ミオシンをエタノール変性によって選択的に除去する方法がとられている (Sent-Györgyi, *et al.*, 1960)。すなわち、前述の沈澱画分に終濃度が 75% となるように冷エタノールを添加した後、0.5 M KCl 溶液に透析してエタノールを除くことにより rod だけを可溶化させ、沈澱にミオシンを除くという方法である。しかし、この方法は過酷な手法であるので、一般に不安定である魚類ミオシンからの rod の調製に適用できるのかという懸念があった。実際にこの方法を試みた結果、rod から完全にミオシンを除去する事はできず、また得られた rod を Sepharose CL-4B ゲル濾過に供すると一部凝集していることを認めた (図示せず)。よってエタノール変性法を用いない、他の方法を検討した。

### (1) コイ・ミオシンからの rod の調製法

これまで、魚類及びウサギのミオシンをピロリン酸存在下でのイオン交換クロマトグラフィーで精製する方法が報告されている(木村ら、1977 b)。そこで、この方法を改良して不純物のミオシンを除去し、rod を単離精製しようとした。それに先立ち、DEAE-クロマトグラフィーによる rod とミオシンの分離条件について検討した。コイ・ミオシン(0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM EDTA) をキモトリプシン消化後、遠心分離(25,000 x g, 20 分)して水溶性の S-1 を除き、沈澱画分のミオシンと rod の混合標品を用いて検討した。この標品をミオシンのクロマトグラフィーと同条件(木村ら、1977 b)の 40 mM Na-PPi (pH 7.5) 溶液で溶解した後、同液で平衡化した DEAE-Toyopearl に供したが、ほとんど吸着されなかった。そこで、Na-PPi 濃度を 20 mM まで低下させたところ、ミオシン及び rod は共に溶解したままで、しかも DEAE-Toyopearl に吸着させることができた。次に、rod とミオシンの分離溶出条件を検討した結果、20 mM Na-PPi (pH 7.5) を含む NaCl 溶液の直線濃度勾配にて溶出させるよりも、Na-PPi の濃度の直線勾配により溶出させた方が分離が良かった。しかし、rod とミオシンのピークは非常に接近しているため、ミオシンを大量に含む rod 標品の精製は難しかった。そのため、ミオシン混入量の少ない粗 rod 標品を用いる事、すなわちミオシン残存量の少ない消化物を調製する事が必要であった。

以上の予備実験に基づいて確立した、コイ・ミオシンからの rod 調製法のフローチャートを Fig. 7 に、また各調製段階の SDS-PAGE 図を Fig. 8 に示す。まず、コイ・ミオシン(0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 0.1 mM DTT, 1 mM EDTA) を、1/250 (w/w) 量のキモトリプシンで 20 °C、30 分消化する。こ

の条件では、ミオシンの約 90 % が切断されて S-1 と rod が生成した。1 mM PMSF で反応停止した後、そのまま遠心分離 (25,000 × g, 20分) して、水溶性の S-1 を上澄画分に除いた。沈殿画分は、0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、0.1 mM DTT 溶液に再懸濁し遠心分離する事により、沈澱中に混入している水溶性成分を除く洗浄操作を一度行った。沈殿の塩溶性画分を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、0.1 mM DTT 溶液で溶解し、次いで 20 mM Na-PPi (pH 7.5) 溶液に透析し、同液に溶解させた。この溶液を超遠心分離して不溶化物を除いて、上澄に粗 rod 標品を得た。

この粗 rod 標品中には少量の未消化ミオシンと LMM とと思われる成分が混入していたので、Na-PPi 存在下での DEAE-Toyopearl によって精製した。すなわち粗 rod を 20 mM Na-PPi (pH 7.5) に平衡化した DEAE-Toyopearl (1.2 × 32 cm) に吸着させた後、20 ~ 50 mM Na-PPi (pH 7.5) の直線勾配により溶出させた。DEAE-Toyopearl 溶出図型を Fig. 9 に示す。rod は約 37 mM Na-PPi 付近に大きなピークとして溶出され、そのピークの高イオン強度側 (約 40 mM) の肩の溶出部分に混入していたミオシンが溶出されたので、この部分を除いた。なお、LMM とと思われる成分は rod のピークより低い Na-PPi 濃度 (35 mM) で溶出され、rod からは完全に除くことができた。rod の画分 (図中の横線をつけた画分) を集めると、ミオシンの約 20% の収率で rod を得ることができた。

なお、この精製 rod は 0.05 M KCl (pH 7.0) 溶液にフィラメント形成するまで透析し、遠心分離 (25,000 × g, 15 min) で集めた後、同溶液で再懸濁して再び遠心分離する事によって Na-PPi を除去する操作を行った。沈澱した rod を 0.5 M KCl (pH 7.5) 溶液で溶解透析し、超遠心分離したのちに rod 標品とした。

この方法によると、ミオシンを出発材料とした場合には 3 日目に、また魚肉か

ら出発した場合には 4 日目に rod の実験に使用できた。

Carp myosin (0.05 M KCl, pH 7.0, 1 mM EDTA) (step A)

- chymotryptic digestion (1/250(w/w), 30 min, 20 °C) (step B)
- centrifuge at 25,000 x g, 20 min

Precipitate

- dissolve into 0.5 M KCl (pH 7.5)
- dialyze against 20 mM Na-PPi (pH 7.5)
- ultracentrifuge at 80,000 x g, 60 min

Supernatant (crude rod)

(step C)

- DEAE-Toyopearl chromatography  
gradient (20 - 50 mM Na-PPi (pH 7.5))

rod fraction

- dialyze against 0.05 M KCl (pH 7.0)
- centrifuge at 25,000 x g, 15 min

Precipitate

- dissolve and dialyze against 0.5 M KCl (pH 7.5)
- ultracentrifuge at 80,000 x g, 60 min

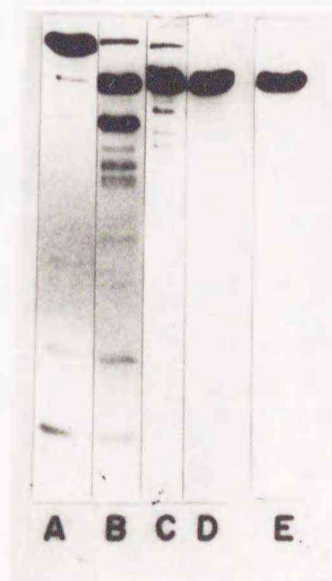
Supernatant  
( rod )

(step D)

Fig. 7. Preparative method of myosin rod from carp myosin.

Fig. 8. SDS-PAGE patterns of rod containing fraction at each preparative step.

(A)-(D) indicate the preparation at each step as shown in Fig. 7. (E) is the SDS-PAGE pattern of rabbit myosin rod.



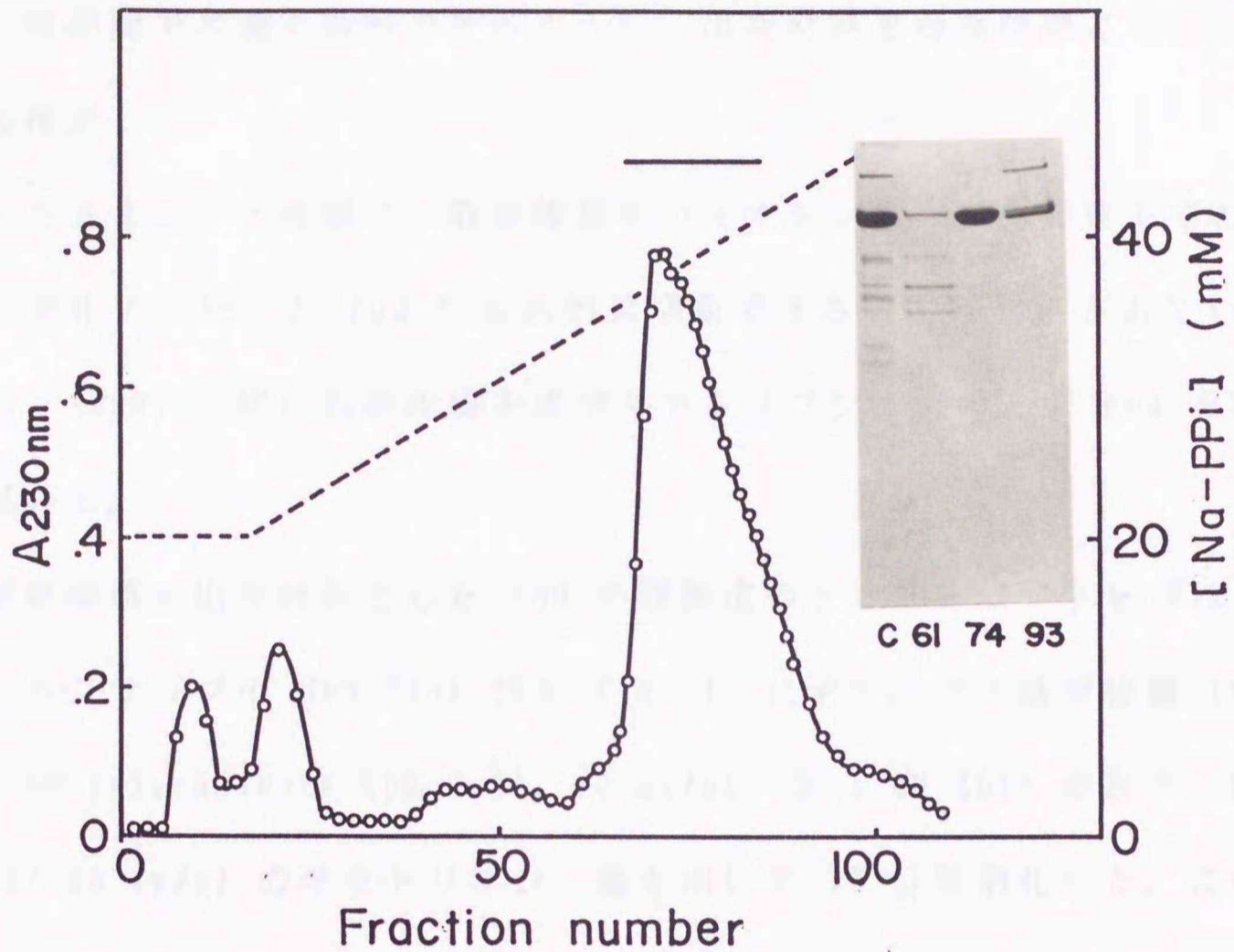


Fig. 9. Purification of carp rod on DEAE-Toyopearl chromatography.

Crude rod fraction obtained from the insoluble fraction of the chymotryptic digests was dissolved in 20 mM Na-PPi buffer (pH 7.5) and applied to a DEAE-Toyopearl column (1.4 X 11 cm) equilibrated with the same buffer. Proteins were eluted with a linear gradient of Na-PPi from 20 to 50 mM (dotted line). The inset figures are SDS-PAGE patterns of the fractions. Fraction numbers are shown below the gels and the starting material of crude rod is also shown as (c).

## (2) 筋原線維を出発材料とした簡便な rod 調製法の開発

前述のミオシンを出発材料とするクロマトグラフィー精製法は、少量の rod を必要とする場合には問題がなかったが、大量の rod 調製には不向きであった。そこでより短時間で大量に調製できるように、出発材料を筋原線維とした調製法についても検討した。

単離したミオシンと同様に、筋原線維中のミオシンも EDTA 存在下でのキモトリプシン消化で、S-1 と rod に選択的に切断できることが報告されているので（今野ら、1990）、次に筋原線維を直接キモトリプシン消化して rod を調製することを試みた。

コイ筋原線維を出発材料とした rod の調製法のフローチャートを Fig. 10 に、ならびに各ステップの SDS-PAGE 図を Fig. 11 に示す。コイ筋原線維（0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), 10 mg/ml) を 1 mM EDTA 存在下、20°C において 1/500 (w/w) のキモトリプシン量を用いて 10 分間消化した。この条件ではミオシン HC の 70~80% が切断をうけ、ほぼ選択的に rod と S-1 が生成し、LMM、S-2 と思われるフラグメントの生成もほとんど認められなかった。PMSF (1 mM) で反応停止後、消化物を遠心分離して消化筋原線維を沈殿に集めた。次いで 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM PMSF 溶液に再懸濁して遠心分離する洗浄操作を行なった。洗浄した消化筋原線維を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解した。このときタンパク濃度が高いと溶液の粘性が高くなるために、次の塩析および遠心分離が困難となったので、8~10 mg/ml 程度が適当だった。この溶解した筋原線維消化物に硫酸を飽和度 40% になるように加え、アクトミオシン、アクト-S-1 を沈澱に除いた。次いで上澄の硫酸濃

度を飽和度 55% まで上昇させて、粗 rod 画分を沈澱に集めた。この粗 rod 画分中には不純物として少量のトロポミオシンが含まれていたため、これらを除く操作を以下に行った。すなわち、粗 rod の沈澱を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解後、0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に透析し、硫酸を除去しつつ KCl 濃度を低下させ、rod をフィラメント形成させた。この rod フィラメントを遠心分離して沈澱に集め、上澄にトロポミオシンを除いた。rod の沈澱を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に溶解、透析後、超遠心分離した上澄を rod 標品として実験に用いた。

なお、rod を沈澱させる硫酸濃度を 55% から 50% に下げると、rod の収量は若干低下するものの、トロポミオシンの混入を防ぐことができた。この場合は塩析後の rod の沈澱を直接 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析して硫酸を除くだけで良かった。この硫酸分画法では rod から LMM を除く事ができないので、筋原線維の消化は rod が LMM にまで切断されない程度に行う事が重要であった。もし LMM が混入した場合は、DEAE-Toyopearl を用いれば除去することができた。

この方法を用いることで、魚肉から出発しても、翌日には使用可能であった。これは魚肉からミオシンを調製するのとほぼ同じ日数であり、ミオシンからの rod 調製法に比べ非常に速やかで簡便であった。なお、筋原線維からの rod の収量は約 5% 弱、魚肉そのものからの収量としては 0.5% 程度となり、ミオシンを経由して調製する方法の場合 (0.3%) よりは多少収率が良かった。

Carp myofibrils (0.05 M KCl, pH 7.0, 1 mM EDTA) (step A)

- chymotryptic digestion (1/500(w/w), 10 min, 20 °C) (step B)
- centrifuge at 8,000 x g, 5 min

Precipitate (step C)

- dissolve into 0.5 M KCl (pH 7.5)
- add (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to make a 40 % saturation
- centrifuge at 14,000 x g, 15 min

Supernatant (crude rod) (step D)

- add (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> to make a 55 % saturation
- centrifuge at 14,000 x g, 15 min

Precipitate (step E)

- dissolve into 0.5 M KCl (pH 7.5)
- dialyze against 0.05 M KCl (pH 7.0)
- centrifuge at 14,000 x g, 15 min

Precipitate

- dissolve and dialyze against 0.5 M KCl (pH 7.5)
- ultracentrifuge at 80,000 x g, 60 min

Supernatant (rod) (step F)

Fig. 10. Preparative method of myosin rod from carp myofibrils.

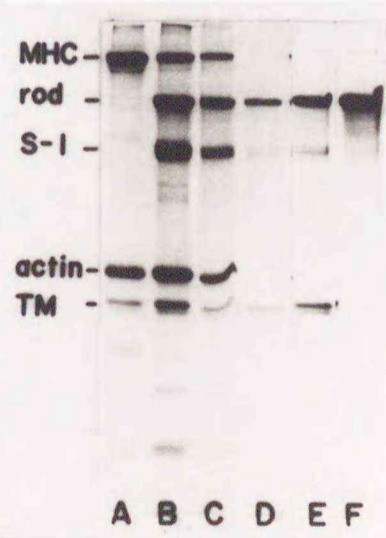


Fig. 11. Preparation of rod from carp myofibrils.

(A) through (F) indicate the SDS-PAGE patterns of rod fractions at each purification step as shown in Fig. 10. MHC and TM indicate myosin heavy chain and tropomyosin, respectively.

## 2. コイ及びウサギ rod の理化学的性質の比較

### (1) 単量体コイ及びウサギ rod のタンパク質化学的性質の比較

前節で述べた方法でコイ筋肉からのみならず、ウサギ骨格筋からも rod を調製することができた。コイ rod の理化学的性質について、ウサギ rod のそれと比較検討した。まず、コイ及びウサギ rod のサブユニットのサイズを SDS-PAGE により比較すると、両者共に 130 kDa と計算され、サブユニットの分子量に差は認められなかった (Fig. 8)。また、未変性条件での分子サイズを比較するため、両 rod を Sepharose CL-4B (1.6×45 cm) ゲル濾過 (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) に供した場合の溶出図を Fig. 12 に示す。いずれの rod も、フラクション番号 35 に単一のピークとして溶出され、溶出位置からコイ rod もウサギ rod と同サイズである事が判り、従って 130 kDa のサブユニット2本から成ることが示された。なお、図示しないが rod より2倍ほどサイズの大きいコイ・ミオシンは、同条件でフラクション番号 32 付近に溶出され、その溶出位置は余りかわらなかった。このため、rod はミオシンのように細長い棒状の分子形をしていることが推定された。

次に、rod の還元粘度のタンパク濃度依存性を測定したが (Fig. 13)、還元粘度のタンパク濃度依存性はもとより、算出した固有粘度もコイ及びウサギ rod で差は認められなかった。次に、両 rod の超遠心沈降分析を行ったところ沈降図形は常に1つのピークからなる均一な標品であり、算出した沈降速度も両者間に差は認められなかった (図示せず)。さらに、両 rod の CD スペクトルを測定したところ、両者共に、222、209 nm 付近に負の極小値を示し、 $\alpha$ -ヘリックス構造を

持つタンパク質の典型的な CD スペクトルが得られ (Fig. 14)、楕円率 ( $\theta$ ) から計算で求めた  $\alpha$ -ヘリックス含量 (Table 2) は 100% を多少越えたが、これはタンパク濃度の誤差によると思われ、コイ rod も 100%  $\alpha$ -ヘリックス構造からなることが示唆された。

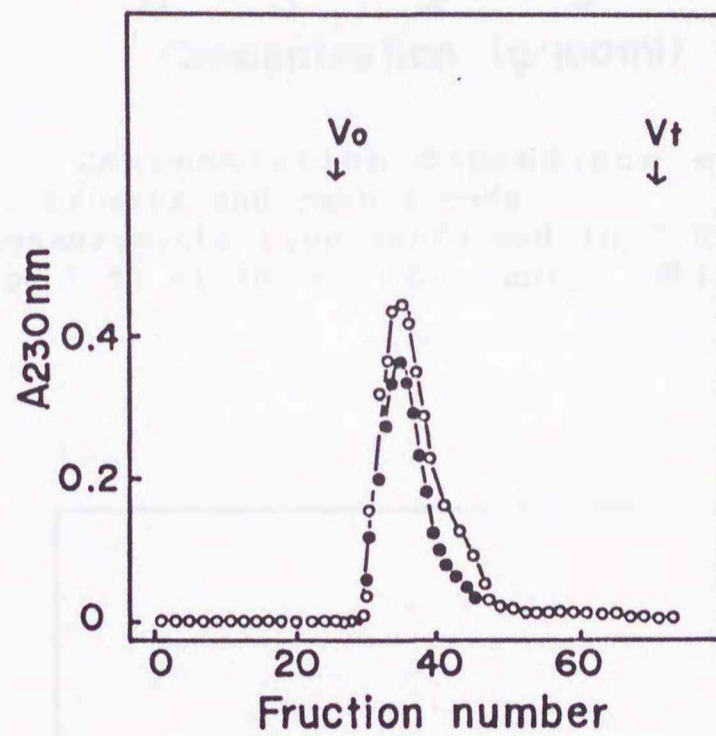


Fig. 12. Gel filtration of rod on Sepharose CL-4B.

Rod from carp (○) and rabbit (●) was applied to Sepharose CL-4B gel column (1.2 x 32 cm) equilibrated with 0.5 M NaCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).  $V_0$  and  $V_t$  indicate the void volume and bed volume, respectively.

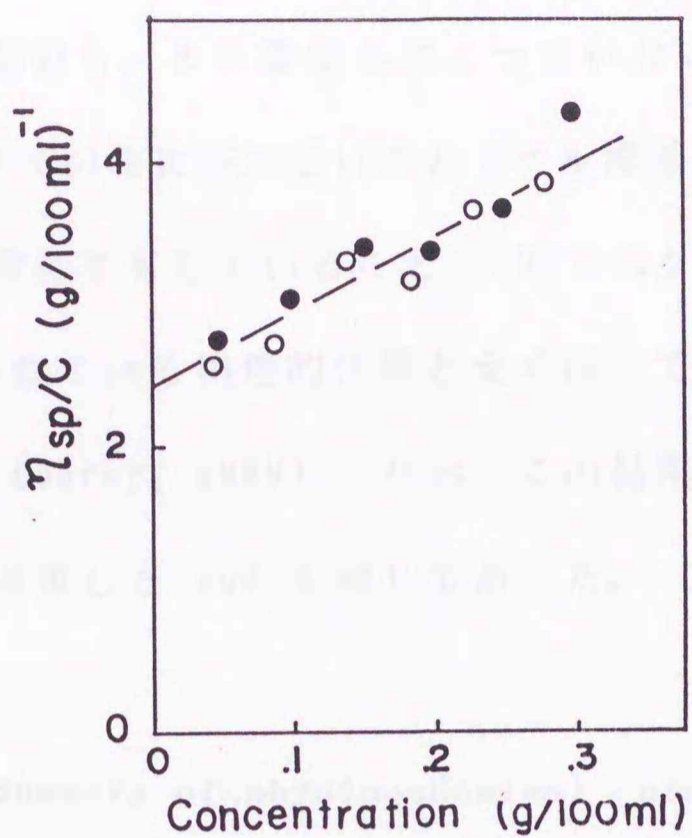


Fig. 13. Concentration dependence of the reduced viscosities of carp and rabbit rods.

All measurements were performed in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) at 10 °C. ( $\circ$ ), carp; ( $\bullet$ ), rabbit.

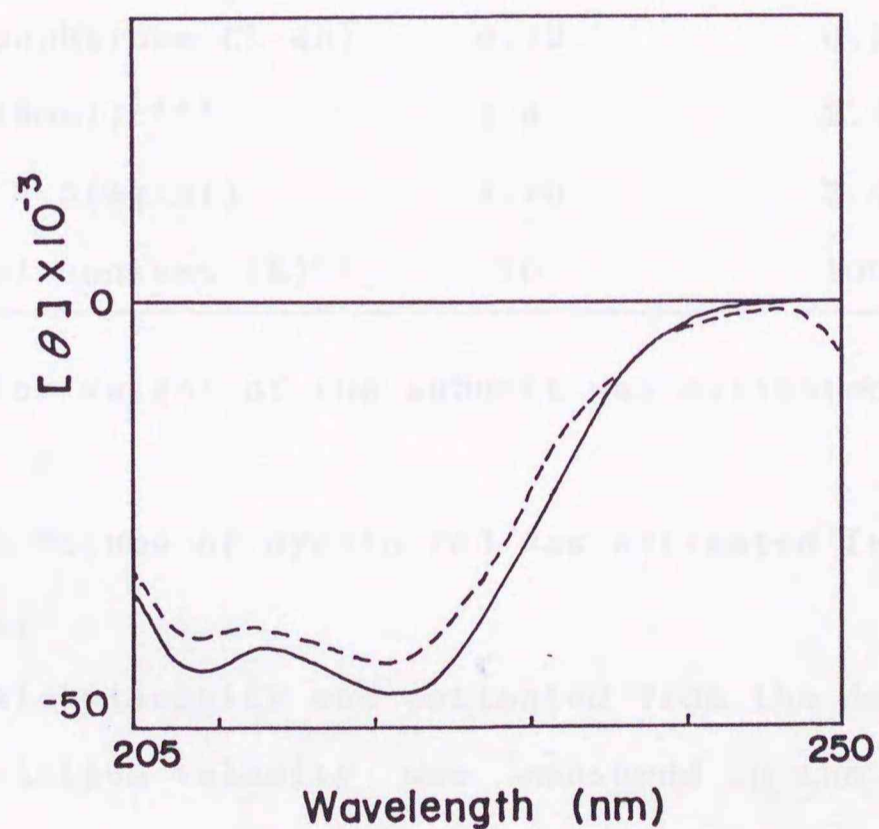


Fig. 14. Circular dichroism spectrum of rod from carp and rabbit.

Circular dichroism spectrum of rod from carp (solid line) and rabbit (dotted line) was measured in the same medium as in Fig. 13.

以上の結果を Table 2 に総括した。それによると、前節の方法で調製したコイ rod は、分子内部の開裂も、また凝集もおこっていないこと、サブユニット構造を有していること、分子の軸比が大きいこと（ゲル濾過、固有粘度、沈降速度）、100%  $\alpha$ -ヘリックス構造を有していること（CD スペクトル）が明らかとなり、ウサギ rod でよく知られている物理的性質と全く同じであると結論した（Weeds & Pope, 1977; King & Lehrer, 1989）。なお、この結果はミオシンから調製した rod も筋原線維から調製した rod も同じであった。

Table 2. Summary of physicochemical properties of carp myosin, carp rod and rabbit rod.

	Carp		rabbit
	myosin	rod	rod
M.W.* <sup>1</sup> (SDS-PAGE)	200,000	130,000	130,000
Kav* <sup>2</sup> (Sephacrose CL-4B)	0.13	0.22	0.22
[ $\eta$ ] (g/100ml) <sup>-1</sup> * <sup>3</sup>	1.6	2.4	2.4
S <sub>20,w</sub> * <sup>4</sup> 4.5 (mg/ml)	4.40	2.45	2.48
$\alpha$ -helical content (%)* <sup>5</sup>	70	100	100

\*<sup>1</sup> Molecular weight of the subunit was estimated from the data in Fig. 8.

\*<sup>2</sup> Elution volume of myosin rod was estimated from the data in Fig. 12.

\*<sup>3</sup> Intrinsic viscosity was estimated from the data in Fig. 13.

\*<sup>4</sup> Sedimentation velocity was measured in the same medium as in Fig. 13 at 20 °C.

\*<sup>5</sup>  $\alpha$ -Helical content was estimated from the data in Fig. 14.

(2) コイ rod のアミノ酸組成

次に調製したコイ rod のアミノ酸分析を行い、ウサギ rod のそれと比較した。結果を Table 3 に示すが、それらは本質的に良く似た組成を示した。すなわち、Glx、Asx量が多く、また Lys も多かった。ここでは Asp、Glu といった酸性アミノ酸の含量は正確には判らないが、電荷を持つアミノ酸を多く含む特徴があった。また、Leu、Ala という疎水性アミノ酸もかなり多く含んでいた。Trp 含量は少なく、ヘリックス構造を破壊する Pro は含まれていなかった。これらアミノ酸組成はコイ及びウサギ rod で差は認められなかった。

Table 3. Amino acid composition of carp and rabbit rods

Amino acid	Carp	Rabbit
Aspartic acid* <sup>1</sup>	8.9	8.8
Threonine	3.6	3.9
Serine	4.8	4.7
Glutamic acid* <sup>1</sup>	26.4	26.8
Proline	0	0
Glycine	2.5	2.5
Alanine	9.4	9.4
Cysteine	0.3	0.6
Valine	4.3	3.6
Methionine	2.5	2.2
Isoleucine	3.0	3.8
Leucine	13.0	12.4
Tyrosine	0.8	0.7
Phenylalanine	0.8	0.9
Lysine	12.2	11.6
Histidine	1.4	1.9
Tryptophan	0.2	0.2
Arginine	5.9	6.0
Total	100.0	100.0

\*<sup>1</sup> Asparatic and glutamic acids including asparagine and glutamine, respectively.

また、rod の吸収スペクトルを測定したところ (Fig. 15)、280 nm 付近に極大を持つスペクトルを示したが、タンパク質濃度から計算した吸光係数  $E_{280\text{nm}}^{1\%}$  は 2.2 となり、ウサギで報告されている値と近似した (Weeds & Pope, 1977)。この値はウサギ・ミオシン、S-1 の場合の 5.6 及び 7.5 という値 (Weeds & Pope, 1977) よりかなり小さく、このことから rod の Trp の含量がコイでもウサギ同様低いことが示唆された。

なお、このようにミオシン分子断片の種類によってタンパク質濃度あたりの 280 nm での吸光値が異なるため、クロマトグラフィーのフラクションに含まれるタンパク質量は 280 nm ではなく、230 nm での吸収値を用いて測定した。230 nm でのモル吸光係数は rod も S-1 も差はなかった。

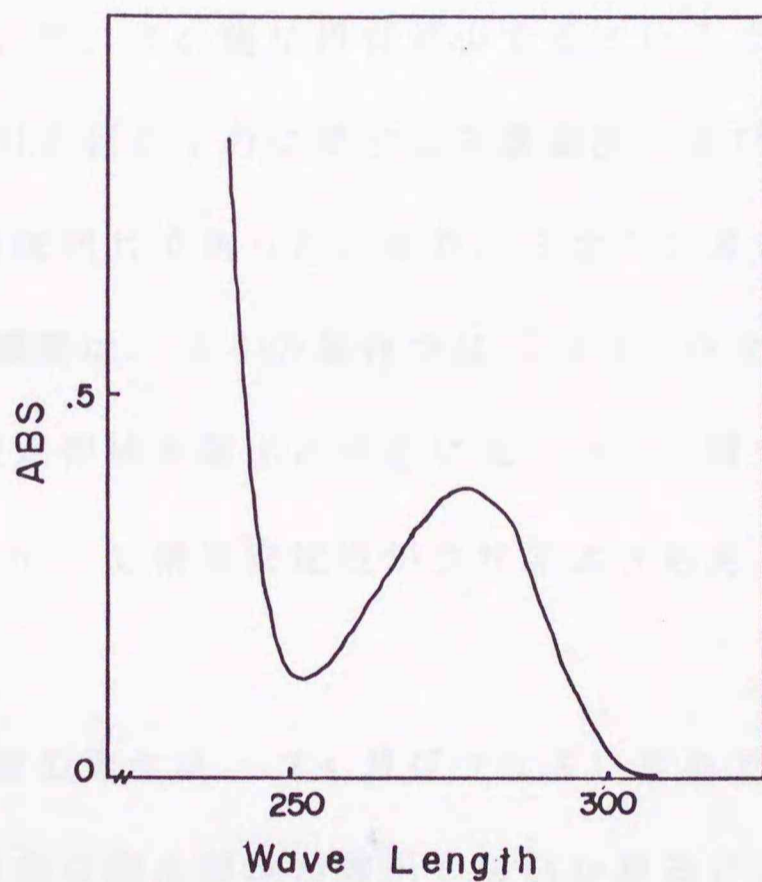


Fig. 15. Absorption spectrum of carp rod.  
Carp rod (1.67 mg/ml) was dissolved in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

### (3) 変性剤存在下におけるコイ rod の構造安定性

次にコイ rod の構造安定性についての情報を得るために、rod に変性剤（尿素、塩酸グアニジン）を添加したときの構造変化をミオシンや S-1 の場合と比較した、またウサギ rod の安定性とも比較した。

まず、疎水領域探査試薬 ANS を用いて構造変化を検出することができないかどうか試みた。ANS はタンパク質の疎水領域に結合すると蛍光強度が著しく上昇するので、タンパク質の分子表面に露出する疎水領域の程度の指標となる。種々濃度の尿素存在下でのミオシン、S-1 及び rod (0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 0.2 mg/ml) 溶液に ANS を添加し、その蛍光強度を測定した (Fig. 16)。

それによると、ミオシン及び S-1 の ANS の蛍光強度は、添加する尿素濃度が高くなるにつれ増加していき、その後再び減少するという二相性の変化を示した。この蛍光強度の変化を引き起こすのに要する尿素濃度、及びその変化の大きさはミオシンと S-1 ではほぼ同じであった。また、ミオシン及び S-1 の ANS 蛍光強度が最大値を示す尿素濃度は、コイの場合では 1.5 M、ウサギの場合では 3 M であり、ウサギ S-1 の疎水領域を露出させるには、コイの場合の約2倍もの濃度を必要とするので、コイ S-1 の構造安定性がウサギよりも劣るという結果と一致する。

一方、rod の蛍光強度の変化は、コイ及びウサギいずれでも見られず、尿素を添加しても ANS 結合可能な疎水領域が露出しないかあるいは存在しないことが考えられる。そのため、ANS 蛍光強度の変化は rod の構造変化を追跡するためには利用できなかった。言い替えると尿素のような変性剤により疎水領域が露出するのはミオシン分子中の S-1 部分であり、これまで ANS を用いてミオシンの構造

変化について議論した研究例もあるが (Wicker & Knopp, 1988; Niwa, *et al.*, 1989)、その場合は S-1 部分についてのみの変化を観察していたことになると考えられる。

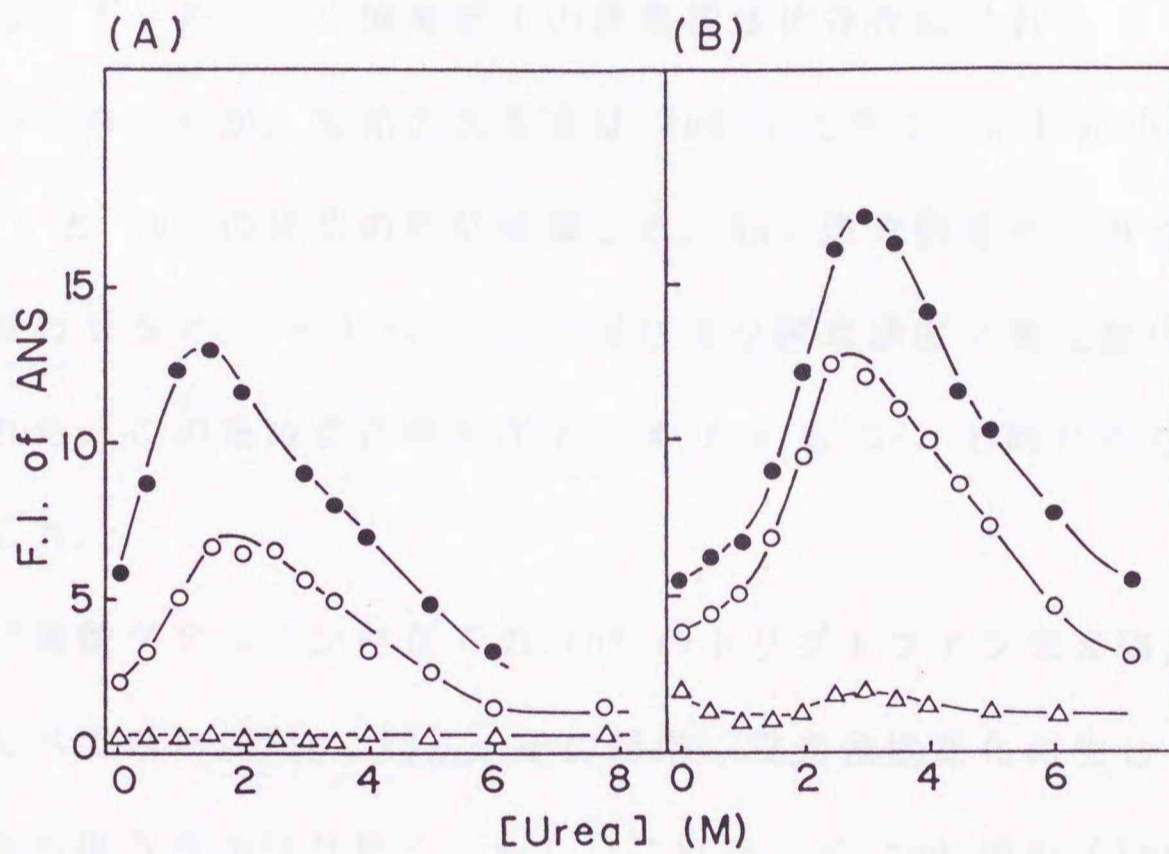


Fig. 16. Effect of urea on ANS fluorescence intensity of myosin, S-1 and rod solutions.

ANS fluorescence intensities (F. I. ) of myosin (○), S-1 (●) and rod (△) solution (0.2 mg/ml) in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) were measured at 20 °C and 20 min after addition of urea and 80 μM ANS. (A), carp; (B), rabbit.

次にトリプトファンやチロシン残基の蛍光強度の変化から構造変化を検出しようとした。まずコミノシン、S-1 及び rod 溶液に尿素を添加したときのトリプトファン蛍光強度の変化を測定した (Fig. 17)。変性剤未添加では、同じタンパク濃度において S-1 及びミノシンの蛍光強度は大きく、rod のそれは小さかったが、これは rod の Trp 含量が少ないためと思われた。なお、ミノシン 1 モルの蛍光強度は、構成している S-1 2モルと rod 1モル分の蛍光強度の和と、ほぼ等しくなることを確かめている。尿素存在下では rod、S-1 及びミノシンの蛍光強度はいずれも低下した。蛍光強度低下の尿素濃度依存性はこれら 3 種の試料間に大きな差はみられないが、変化の大きさは rod が大きく、S-1 が小さく、ミノシンは丁度 S-1 と rod の変化の和に近似した。ANS 蛍光強度からみた S-1 の尿素耐性と考え合わせると、rod も S-1 と同じ様な尿素濃度で構造変化が起こっていると思われた。このため変性剤存在下では rod も S-1 と同じくらい不安定であると推測した。

尿素および塩酸グアニジン存在下の rod のトリプトファン蛍光強度変化をコイとウサギで比べてみた (Fig. 18)。その結果、蛍光強度変化の生じる変性剤濃度はコイの場合のほうがかなり低く、もし、これをコイ rod 内の (Trp 近傍の) 水素結合の強さを反映しているとするれば、ウサギのそれに比べかなり弱いことになる。このため、コイ・ミノシンにおいて S-1 だけでなく rod 部分もウサギより不安定であることが推測された。

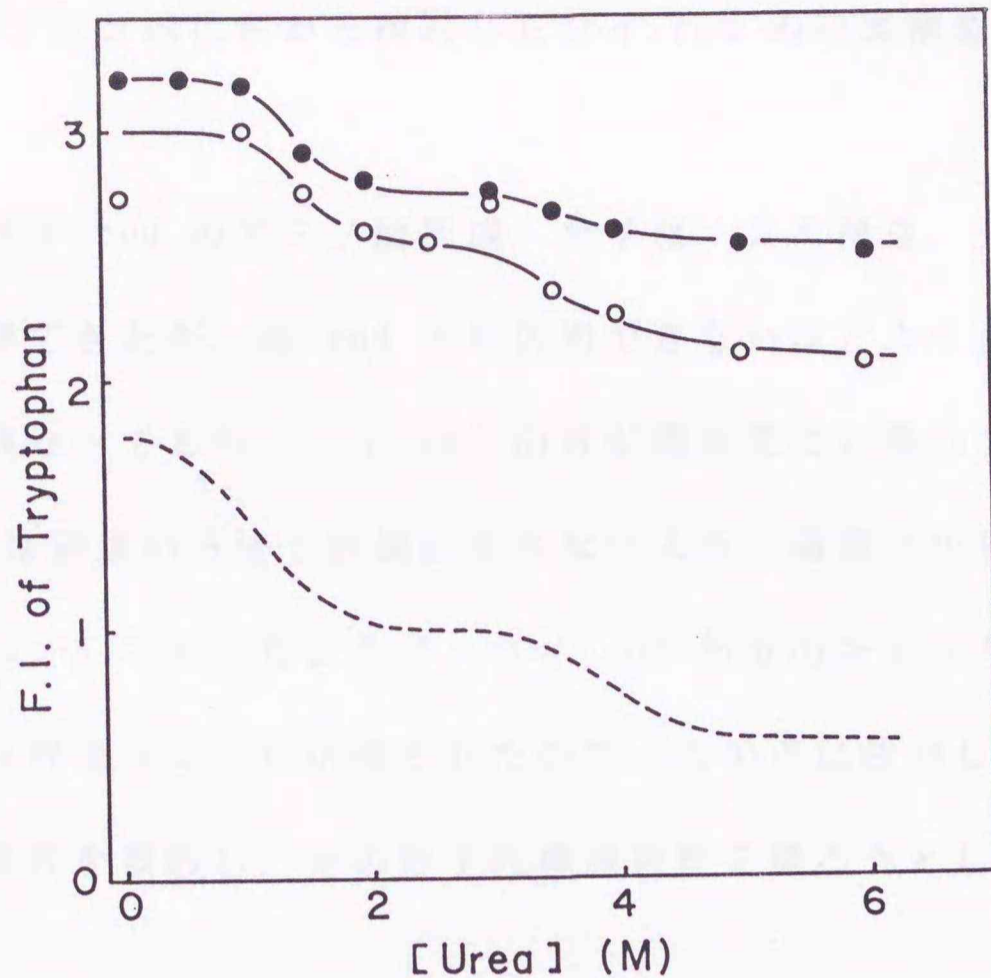


Fig. 17. Effect of urea on the tryptophan fluorescence intensity of carp myosin, S-1, and rod.

Tryptophan fluorescence intensities (F. I.) of carp myosin (○), S-1 (●) and rod (dotted line) solution (0.2 mg/ml) in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) were measured in the presence of varied concentrations of urea at 20 °C.

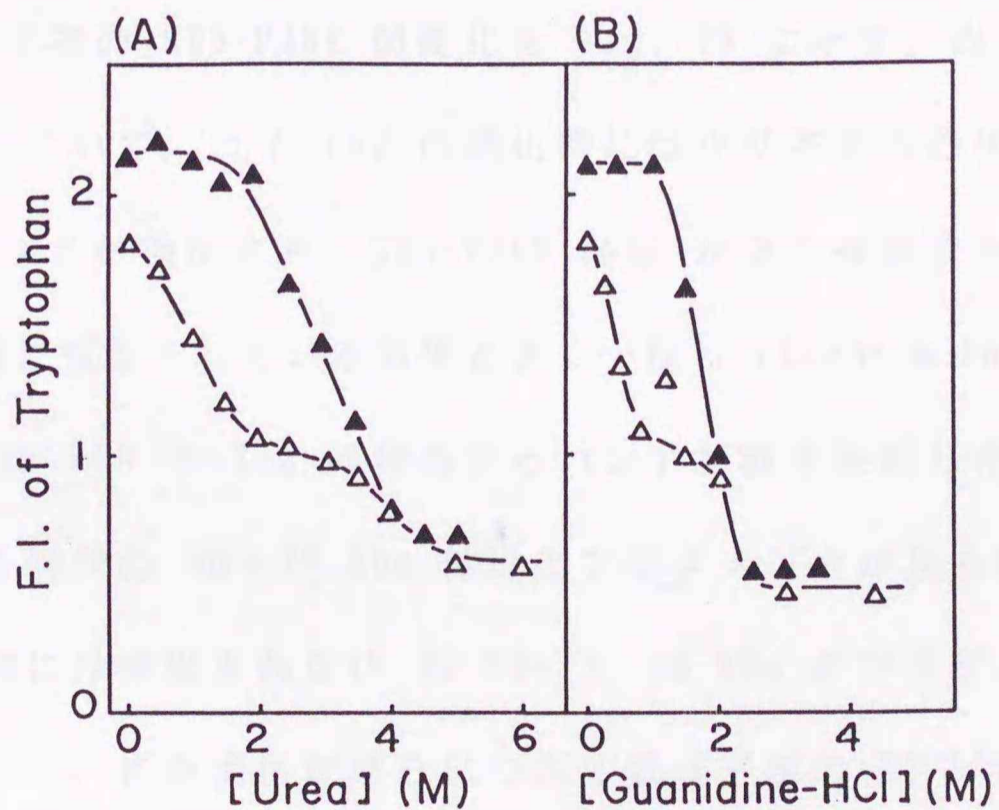


Fig. 18. Effect of urea and guanidinium-HCl on the tryptophan fluorescence intensity of carp and rabbit rods.

The fluorescence intensities (F. I.) of carp (Δ) and rabbit (▲) rods (0.2 mg/ml) in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) were measured in the presence of varied concentrations of urea (A) or guanidinium-HCl (B) at 20 °C.

### 3. キモトリプシン消化性から検討したコイ rod の内部構造

コイ及びウサギ rod のアミノ酸組成、分子量、2次構造、分子形などの構造に関する情報を得てきたが、両 rod とも区別できないほどよく似ていた。しかし、構造安定性は異なっており、コイ rod の方が構造変化し易いことが推測されたので、両 rod には前述の方法では検出されないような構造上の違いがあると思われた。すでに Fig. 5 で述べたように、コイ rod 部分のキモトリプシン消化性はウサギの場合とは異なることが示唆されたので、この点に注目して、コイ rod のプロテアーゼ感受性を検討し、その分子内構造特性を探ろうとした。

#### (1) コイ rod の キモトリプシン消化生成物

コイ及びウサギ rod に存在する切断部位について検討するため、0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) の条件で rod をキモトリプシン消化した。消化時間経過に伴う rod 消化物の SDS-PAGE 図変化を Fig. 19 に示す。両 rod の消化パターンはかなり違って、コイ rod の消化物にはウサギからの生成物には認められない数種のバンドが検出され、SDS-PAGE 図はかなり複雑であった。ウサギ rod の消化物は既に報告されている結果とよく一致し (Weeds & Pope, 1977)、70~60 kDa 付近に LMM や S-2 の相当するバンドが数本生成した。コイ rod の消化生成物中にも同様の 60~70 kDa 付近のフラグメントが見られたが、ウサギ rod からの生成物には検出されない 95 kDa と 40 kDa のフラグメントが消化初期から生成していた。また消化が進むにつれて低分子量の 33 kDa、20 kDa フラグメントが生成してきた。これらもウサギ rod からは見られない成分であった。

これらの結果はコイ rod 内部にキモトリプシン感受性の高い部位がウサギに比べ多数存在することを示唆している。

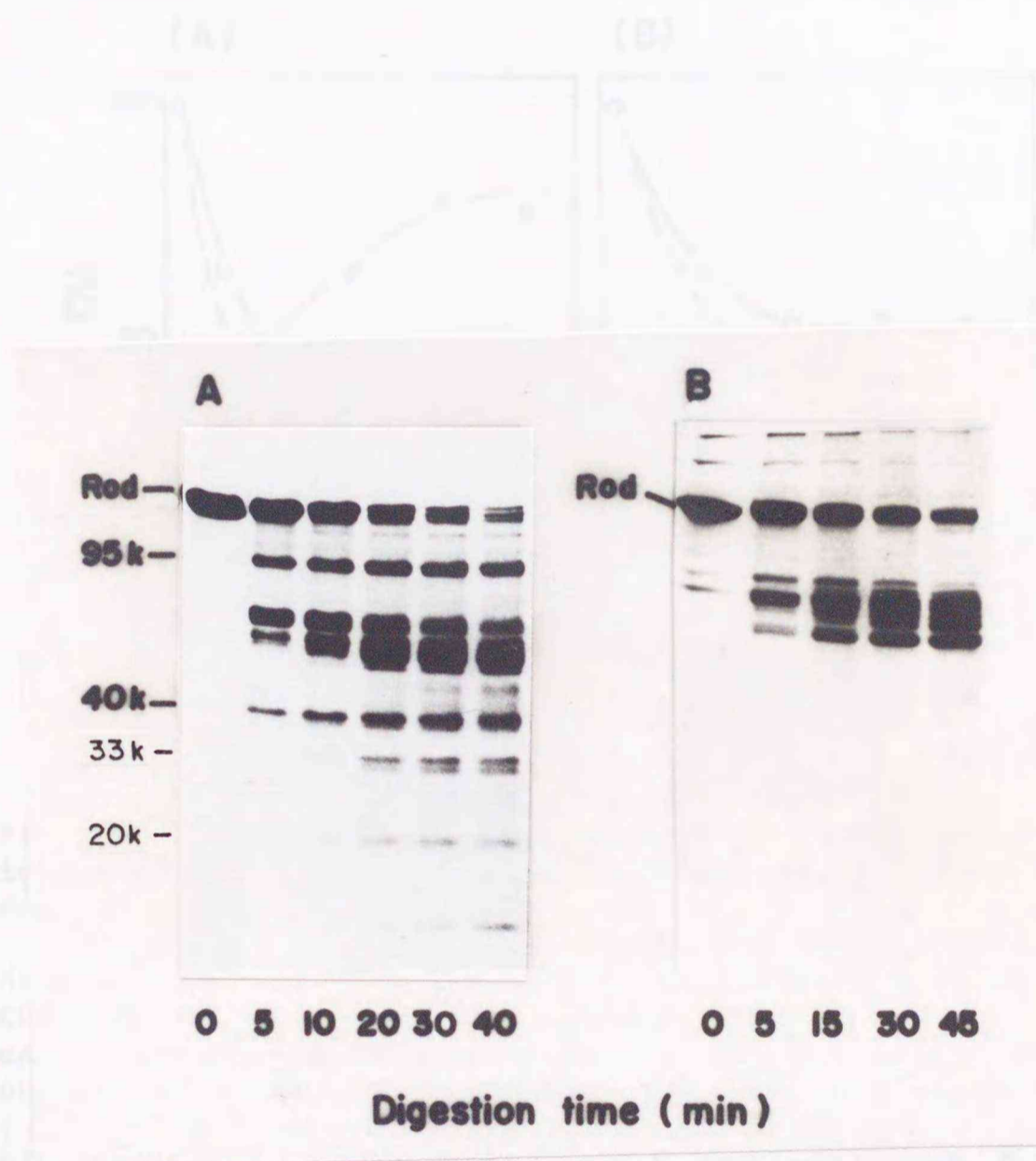


Fig. 19. Changes in SDS-PAGE pattern of carp and rabbit rods during chymotryptic digestion.

Carp and rabbit rods in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) were digested by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C. (A), carp; (B), rabbit.

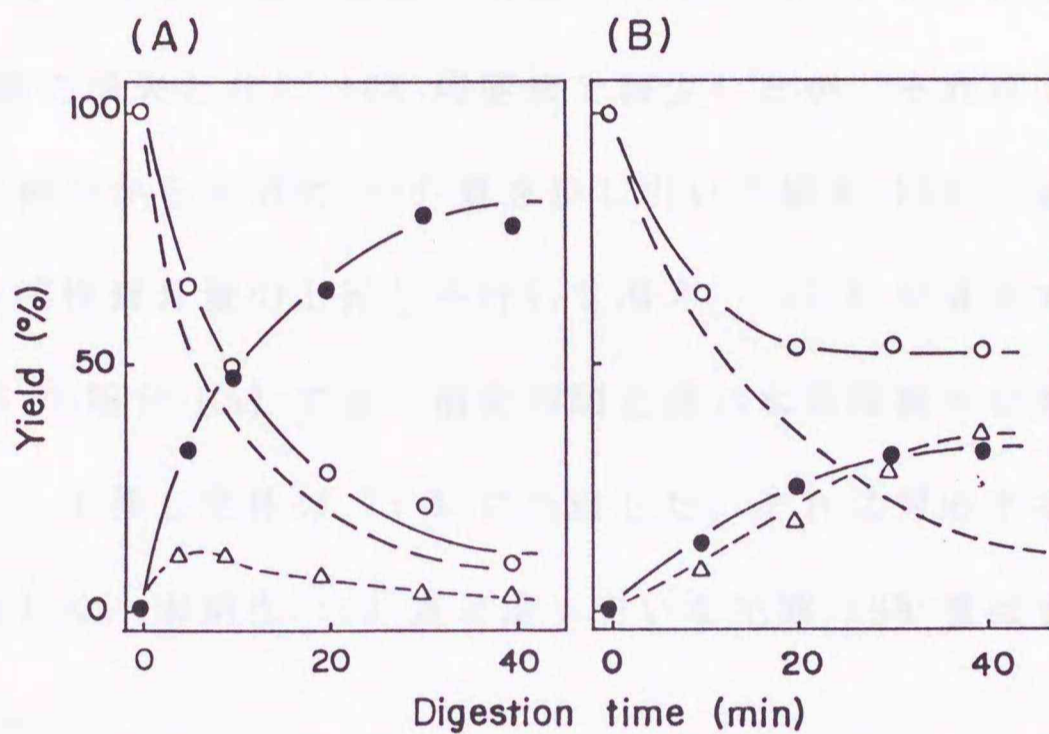


Fig. 20. Change in the amount of water-soluble and insoluble fractions produced by chymotryptic digestion of rod.

Rod from carp (A) and rabbit (B) was digested as described in Fig. 19. The digest was dialyzed against 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.5) and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and centrifuged at 80,000 x g for 60 min. The protein concentration of the supernatant (●) and of the precipitate (○) was determined by the micro-biuret method. The amount of undigested myosin rod (----) was estimated from the staining intensity of myosin rod in the digest. The amount of water-insoluble fraction generated (Δ) was estimated by subtracting undigested rod from the water insoluble fraction.

次に、消化生成物を水溶性 S-2 と、塩溶性の LMM に分画した。すなわちコイ及びウサギ rod のキモトリプシン消化物を 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 6.5)、5 mM MgCl<sub>2</sub> 溶液に透析し、その後、超遠心分離して水溶性画分を上澄に、塩溶性画分を沈澱に回収した。両画分に含まれる総タンパク質量を定量し、その経時変化を Fig. 20 に示した。ウサギ rod の場合 (B) は、分解が進むにしたがって消化物中の水溶性画分量は増加し、全体の 35 % 程度に達した。塩溶性画分量は rod 量の消失と共に 50% 程度まで減少したが、それ以上減少しなかった。この塩溶性画分から未消化 rod 量を差し引いた値を LMM 生成量と推定すると、その量は水溶性画分量の上昇と平行して増え、40 % 付近まで上昇していた。一方、コイ rod の場合 (A) では、消化時間と共に水溶性画分に回収されるタンパク質量は著しく上昇し全体の 75 % にも達した。それに対応するように塩溶性画分の減少は著しく、未消化 rod 量と差し引いた生成 LMM 量はせいぜい数 % 程度にとどまった。

次にこれら rod 消化物の水溶性、塩溶性画分に回収される成分を SDS-PAGE で解析した (Fig. 21)。ウサギ rod の消化生成物は水溶性の 70 kDa 及び 55 kDa の long S-2 及び short S-2 と呼ばれる成分と、塩溶性の LMM (72 kDa、63 kDa) から成っており、これまでの報告の通りである (Weeds & Pope, 1977)。一方、コイ rod 消化物に含まれている成分のうち、水溶性画分中には、ウサギ S-2 と良く似た 65 kDa 及び 55 kDa のフラグメントの他に、ウサギ水溶性 (S-2) 画分には認められない 95 kDa フラグメントが含まれていた。以下、これら 65 kDa および 55 kDa のフラグメントを 65k S-2 および 55k S-2 フラグメント、95 kDa のフラグメントのことを 95k S-2 フラグメントと呼ぶ。また、長時間消化した場合は 20 kDa という小さなフラグメントも含まれていたが、これもウサ

ギ rod からは生成されない水溶性成分であった。これを以下 20k フラグメントと呼ぶ。

コイ rod 消化物の塩溶性画分中には、量的には非常に少ないもののウサギの LMM のサブユニットに対応する 70 kDa 及び 62 kDa フラグメントが検出された。またこの画分には、40 kDa という短いフラグメントが含まれていたが、この成分は塩溶性の性質を示すことから、LMM を構成するフラグメントであると判断された。以下、このフラグメントを 40k LMM フラグメントと呼ぶことにする。後ほど示すように (Fig. 27)、この塩溶性画分を 0.5 M KCl 溶液で溶解した後、ゲル濾過 (Sephacrose CL-4B) に供したところ、40k LMM フラグメントは他の LMM 成分よりも遅れて溶出されたので分子内開裂断片ではない事、また溶出位置から 2 量体として存在している事を確かめている。

コイ rod 特有の消化生成物である塩溶性の 40k LMM フラグメントと 95k S-2 フラグメントの生成過程について SDS-PAGE 上の染色強度を測定して比較した (Fig. 22)。図中に 60~70 kDa の S-2 及び LMM 成分の総量を示したが、95 k S-2 フラグメントも 40k LMM フラグメントも他の LMM 及び S-2 成分と同様に消化初期から生成していた。染色強度からは 95k S-2 フラグメントの方が 40k LMM フラグメントよりも多少多く生成しているように見えるが、その生成量をモル当たりに換算して表すと (Fig. 22 B)、消化初期には両者は等モルずつ生成しているようだった。このため、rod が選択的にある部位で切断されて、95k S-2 と 40k LMM フラグメントが生成することが推測された。これら両フラグメントのサイズを足し合わせると rod のサイズ (130 kDa) となることからこの推測は支持される。95k S-2、40k LMM フラグメント量を足し合わせた値を Fig. 22 A 中に示したところ、消化後期では通常の S-2、LMM 量の約 50 % にまで達し

た。

このため、コイ rod 中には HMM/LMM junction の他に 95k S-2 と 40k LMM フラグメントを生成させる 切断部位が存在する事、そして その部位は HMM/LMM junction 程ではないにしてもかなり選択的に切断を受ける事が示唆された。

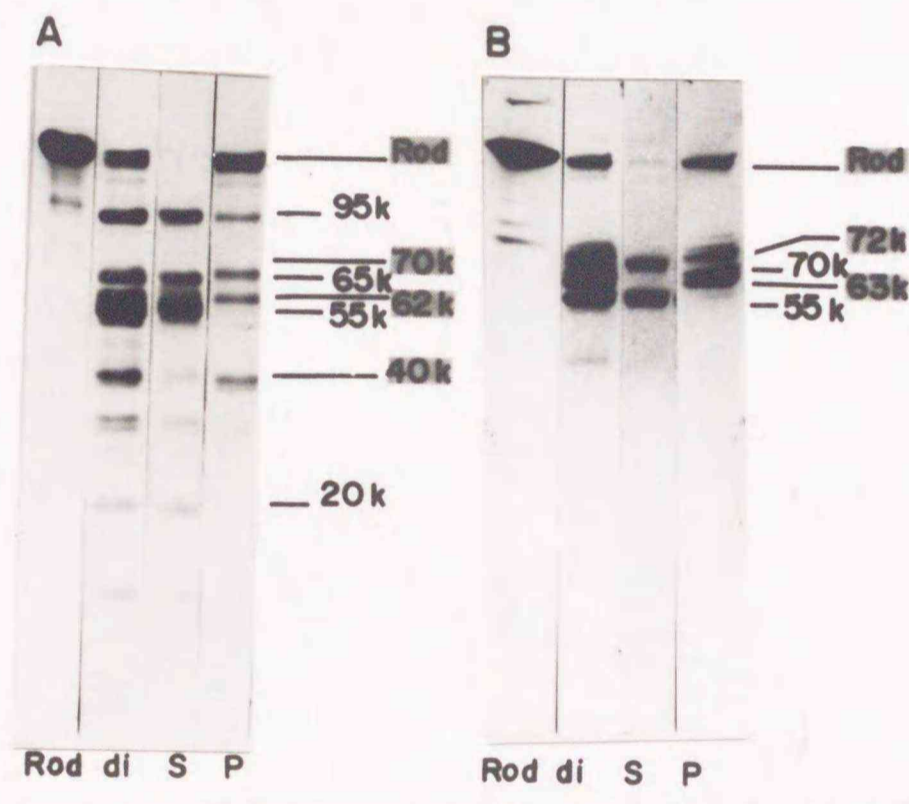


Fig. 21. SDS-PAGE patterns of the water-soluble and the water-insoluble fractions of myosin rod digest.

Rod (Rod) from carp (A) and rabbit (B) was digested by chymotrypsin for 60 min as described in Fig. 19. The digest (di), the supernatant (S) and the precipitate (P) were separately recovered as described in Fig. 20. Numbers on the right side of the gels are molecular mass of each fragments in kDa, and numbers in net are water-insoluble fragments.

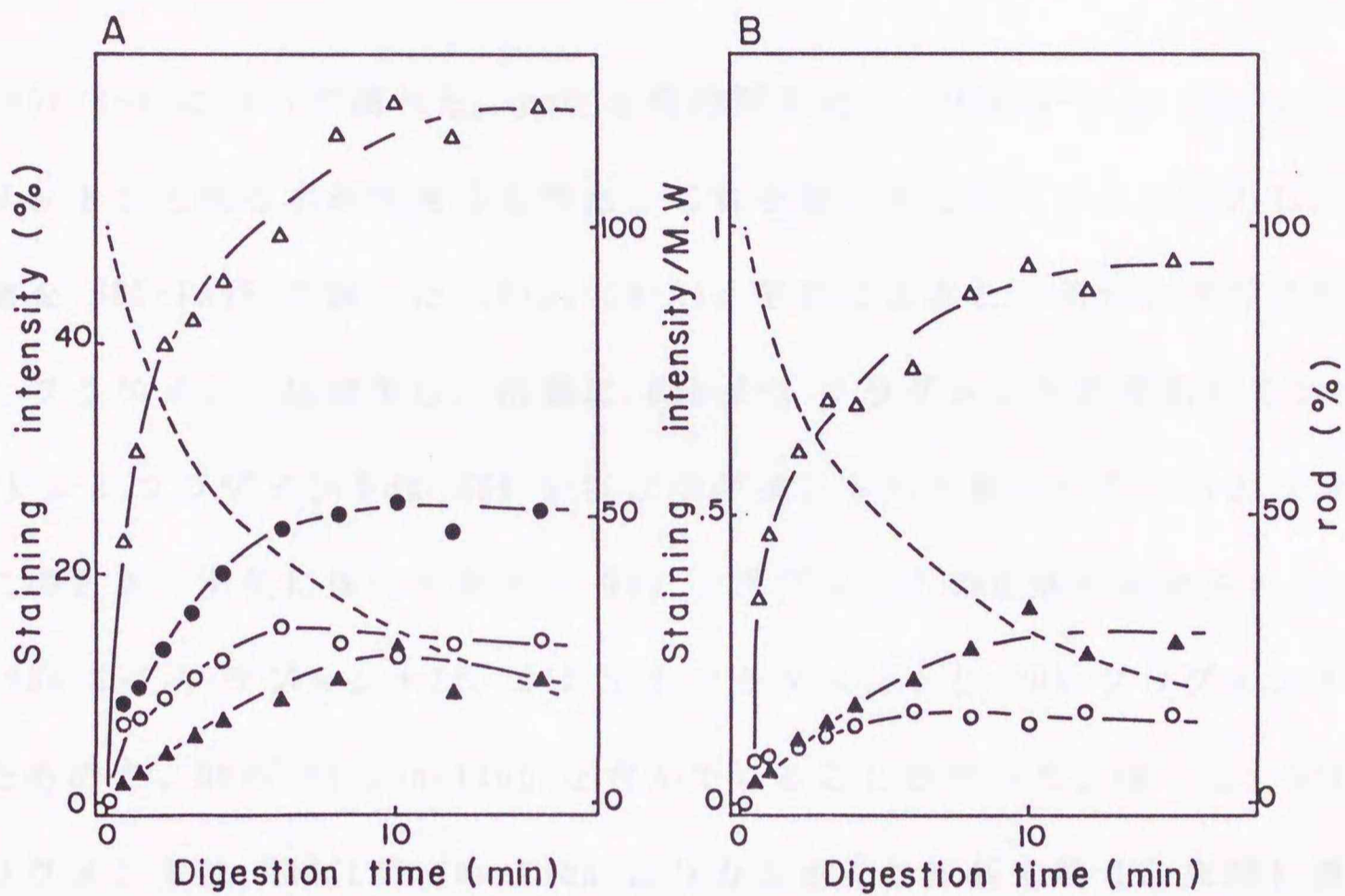


Fig. 22. Production of the 95 kDa and 40 kDa fragments by chymotryptic digestion of carp rod.

Decrease in the undigested rod (dotted line), production of 95k S-2 (○), 40k LMM (▲) and the sum of 60-70 kDa LMM and S-2 (△) were densitometrically estimated from the same data as in Fig. 19. The sum of 95k S-2 and 40k LMM (●) were also estimated.

(2) コイミオシン rod 内の切断部位の同定と、生成物の rod 内配列

コイ rod から生成する 95k S-2 フラグメントと 40k LMM フラグメントが rod のどこに位置した部分なのかを明らかにし、コイ rod 特有の切断部位の同定を試みた。

まず 95k S-2 について調べた。rod を短時間消化し、95k S-2 と 65k S-2 のフラグメントから成る水溶性画分を得た。これを更にキモトリプシン消化し、消化生成物を SDS-PAGE で調べた (Fig. 23 A)。それによると、消化の進行に伴い 95k S-2 フラグメントは消失し、次第に 65k S-2 フラグメントが増加していった。この 65k S-2 フラグメントは 55k S-2 フラグメントへと移行しているようであった。このとき、消化に伴って新たに 20k フラグメントの生成が認められた。このため 95k S-2 フラグメントは、65k S-2 フラグメントと 20k フラグメントが結合したもので、HMM/LMM junction を含んでいることが判った。従って、95k S-2 フラグメントは HMM/LMM junction よりカルボキシル基末端 (C 末端) 側に 20 kDa だけ長いこと、言い換えると 65k S-2 フラグメントの C 末端側に 20k フラグメントが結合しているものであることが推測された。

次に塩溶性の 40k LMM フラグメントは LMM の一部であることが推測されるがその点について検討した。まず rod 消化物中の塩溶性画分から、DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーにより rod と 40k LMM を除き、70k LMM と 62k LMM の混合画分を得た (分離条件及び溶出パターンは Fig. 28 に示す)。そしてこの LMM を更にキモトリプシン消化した。この 70k LMM と 62k LMM は rod の消化時と同じ条件ではあまり消化を受けなかったため、キモトリプシン量を増加して消化を行った (Fig. 23 B)。消化の程度は小さいが、70k LMM フラグメントが減少し、

62 k LMM が増加した。また、新たに 40k LMM フラグメントと 20k フラグメントが生成することが示された。また消化が進むと 33k フラグメントの生成も認められた。このことから、70k LMM フラグメントは 40k LMM フラグメントと 20k フラグメントから成ることが判明した。この時生成した 20k フラグメントは 95k S-2 フラグメントのキモトリプシン消化で生成した 20k フラグメントと分子サイズが一致したので、95k S-2 フラグメントの C 末端側と 70k LMM フラグメントのアミノ末端 (N 末端) 側に共通して含まれているものと判断した。これらの結果より 70k LMM 内にはその N 末端から約 20 kDa の位置に切断部位が含まれており、40k LMM は 70k LMM の C 末端 (rod の C 末端) に位置している事が判った。

以上、同定した各 S-2、LMM フラグメントの配置及びコイ rod 上のキモトリプシン切断部位を模式的に Fig. 24 に示す。コイ rod 上にはキモトリプシンによる切断部位が主に 2 箇所存在している。このうち、Site 1 はウサギ rod でよく知られている切断部位、すなわち HMM/LMM junction に相当し、Site 1 のみで切断が起こると 65k S-2 フラグメントと 70k LMM フラグメントが生成する。また、この Site 1 にはいくつか (少なくとも 3 箇所) の切断部位が含まれているので、それ以外の 60~70 kDa 付近のフラグメントも生成する。一方、Site 2 は本研究で新たに見いだした切断部位であり、ここでの切断によって rod は 95k S-2 フラグメントと 40k LMM フラグメントに切断される。以下この Site 2 を 95k S-2/40k LMM junction と呼ぶこととする。この 95k S-2/40k LMM junction はウサギの場合には検出されず、コイ rod に特有の切断部位であった。なお、Sites 1、2 の両方で切断が起こると、65k S-2 フラグメントと、20k フラグメント、40k LMM フラグメントが生成する。rod 上での Sites 1、2 での切断速度を比較する

ため、コイ rod 消化初期における 95k S-2 フラグメント及び 40k LMM フラグメントの生成速度を、65k S-2 フラグメント及び 70k LMM フラグメントのそれらと比較したところ (Fig. 22 B)、95k S-2/40k LMM junction の切断速度は、HMM/LMM junction の切断速度の約 2/5 程度であり、かなり速く切断されていることが示された。

なお、コイミオシン (0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) をキモトリプシン消化した時も (Figs. 5, 25)、前述と同様に 40k LMM フラグメントが生成しており、95k S-2/40k LMM junction での切断はミオシン単量体においても rod と同様に起こることを確認した。このとき 95k S-2 の生成はみられないが、その代わりに 170 kDa 程度のサイズを持つ長い HMM HC フラグメントが生成しており、S-1 と 95k S-2 が結合している HMM であると考えられた。

95k S-2/40k LMM junction は通常の LMM 内に存在しているので、コイ rod は LMM (70k LMM) 内でも分解されている事になる。そして、その N 末端側の 20 kDa やその部分を含む 95k S-2 は水溶性となり、低イオン強度下で沈澱するという LMM 本来の性質は失われる。そのために塩溶性画分中には残存した 70k LMM と 40k LMM だけが残ることとなり、コイ rod からの LMM 収量が少ないのはそのためではないかと思われた (Fig. 20)。

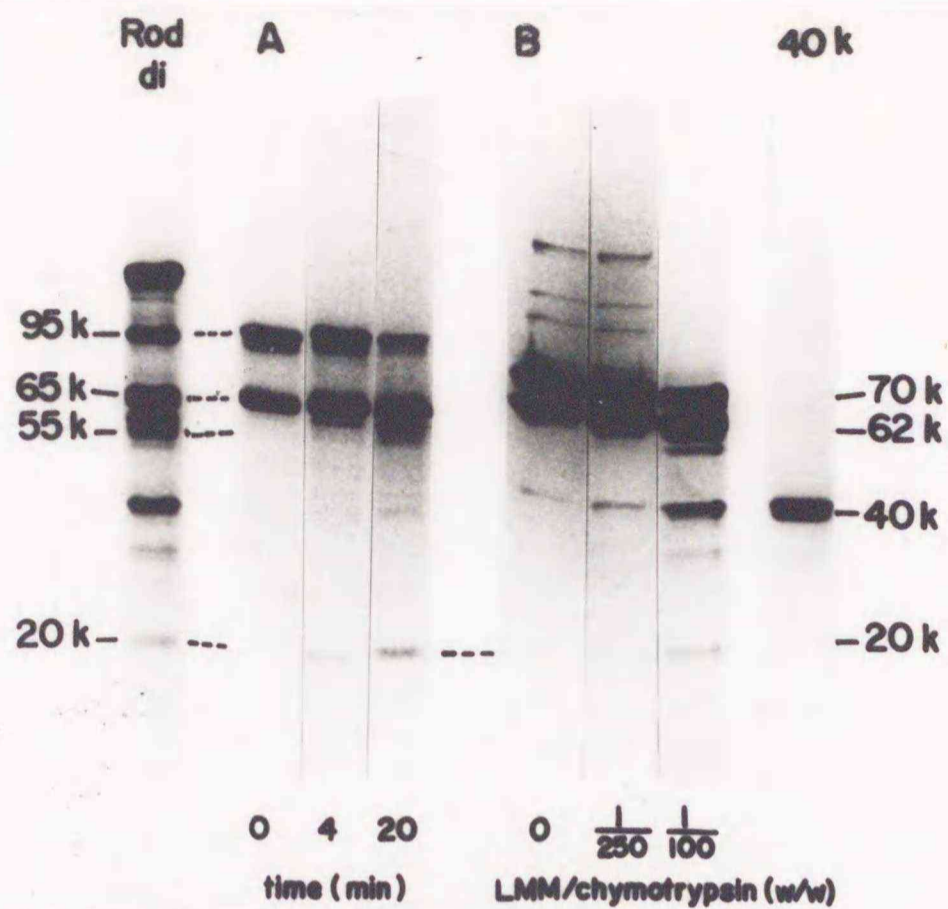


Fig. 23. Chymotryptic digestion of S-2 and LMM fractions. A, Water-soluble fraction was obtained by chymotryptic digestion of carp rod for 5 min as described in Fig. 19. The S-2 fraction was further digested by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C. B, Carp LMM fraction containing the 70 kDa and 62 kDa fragments was separated from water-insoluble fraction of rod digest on DEAE-TOYOPEARL as in Fig. 28, and was further digested at 20 °C for 20 min by using 1/250 (w/w) or 1/100 (w/w) of chymotrypsin. The numbers on the side of the gels are molecular mass of the fragments in kDa. 40k is the isolated 40kDa LMM on DEAE-TOYOPEARL.

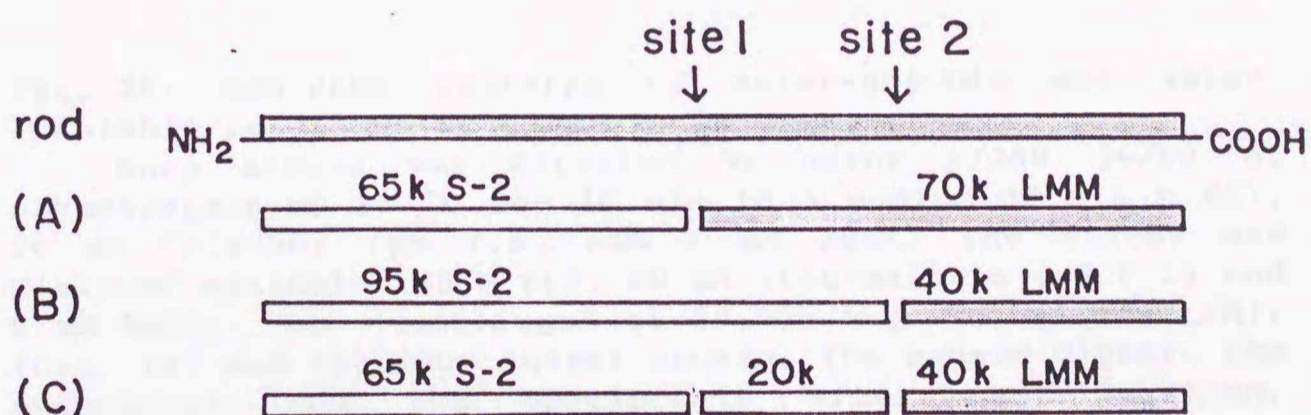


Fig. 24. Chymotryptic cleavage sites and fragments produced. Site 1 and site 2 indicate the sites susceptible to chymotryptic digestion. (A) and (B) represent the S-2 and LMM produced by cleavage at each site, and (C) represents the products formed by cleavage at both sites.  and  indicate the water-soluble and filament-forming fragments, respectively.

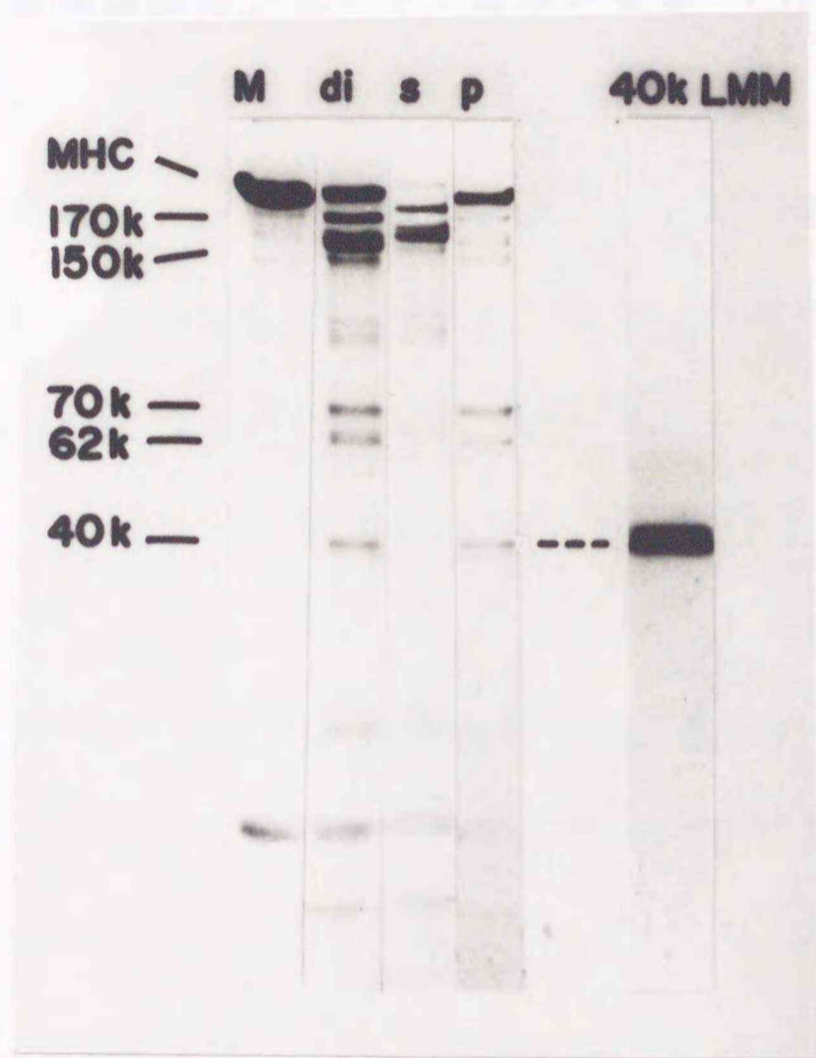


Fig. 25. SDS-PAGE patterns of water-soluble and water-insoluble fractions of carp myosin digest.

Carp myosin was digested by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C for 10 min in a medium of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA. The digest was dialyzed against 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 6.5) and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and centrifuged at 80,000 x g for 60 min. (M), (di), (s) and (p) show intact myosin, the myosin digest, the supernatant and the precipitate after centrifugation, respectively.

### (3) 各種魚類 rod のキモトリプシン消化性

コイ rod で見いだされた 95k S-2/40k LMM junction は魚類ミオシン rod に共通して存在しているのかを調べた。

筋原線維からの直接調製法によって、数種の魚種（ハマチ、マサバ、ヒラメ、クロマグロ、ティラピア）から rod を調製した。調製した rod 標品中には少量の LMMと思われる成分が混入しているものもあったが、本研究の主目的であるキモトリプシン消化性の検討には使用可能と判断できるものであった。これらの rod（0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)）をキモトリプシンで消化し、消化生成物を水溶性、及び塩溶性画分に分画した。両画分の SDS-PAGE 図を Fig. 26 に示す。

これによると魚類 rod 消化物の水溶性画分中には共通して 65k S-2 フラグメントに相当するフラグメントが検出された。また、サバ及びヒラメ rod の消化物中に 95k S-2 フラグメントに相当するフラグメントが見られた。Fig. 26 ではハマチ及びティラピア rod からの 95k S-2 フラグメント生成量は少ないが、より消化条件をきつくすると生成量が増加する事を確認している。また、マグロ rod からの 95k S-2 フラグメント生成量は少なかったが、20k フラグメントに相当するバンドがかなり生成していた。これら、S-2 フラグメントの分子量は魚種間でほとんど差はなかった。

一方、塩溶性画分中の成分に関しては魚種により多少異なり、まずコイ以外の魚類 rod は一律に 10 kDa 程大きかった。中にはヒラメのようにコイと同じサイズとそれより大きい2種の rod が検出されるものもあった。また塩溶性の生成物（LMM に相当する）の分子サイズも、コイからのものよりも一律に大きかった。

すなわち、コイでは 70k、62k、及び 40k の3成分が検出されるのに、他の魚種においては生成される 3 成分がすべてコイのそれらよりそれぞれ約 8~10 kDa 程大きいサイズであった。そこでこれら各種魚類の rod、及びキモトリプシン消化で生成した LMM フラグメントの分子量を Table 4にまとめた。rod から生成した S-2 成分の生成物のサイズが互いによく似ていることを考え合わせると、コイ以外の魚類の rod は C 末端側が長く、そのため rod や LMM が一律に長いと推測した。

検討した全ての魚類 rod から 40k LMM とよく似た短い LMM が生成したので、これら rod 内には HMM/LMM junction の他に、コイ rod で見いだされた 95k S-2/40k LMM junction が存在していると考えた。この部位での切断速度あるいは感受性は魚種で異なり、ハマチ、サバはコイと非常によく似ており、かなりの 95k S-2 フラグメント、40k LMM フラグメントが生成し、この部位での切断が起こりやすいと推定された。また、マグロでは 95k S-2 フラグメントは少ないものの、40k LMM フラグメント及び 20k フラグメントはかなり生成しているので、95k S-2/40k LMM junction で切断された後、95k S-2 フラグメントはただちに HMM/LMM junction で消化をうけて通常の S-2 フラグメントに変化しやすいと推定した。一方、ティラピア rod からは 47k LMM 生成量はさほど多くなく、95k S-2/40k LMM junction での切断は起こりにくいようであった。

以上の結果より、それぞれの部位での切断速度に魚種差があることが示唆されたものの、95k S-2/40k LMM junction は魚類 rod に共通して存在していることが示唆された。

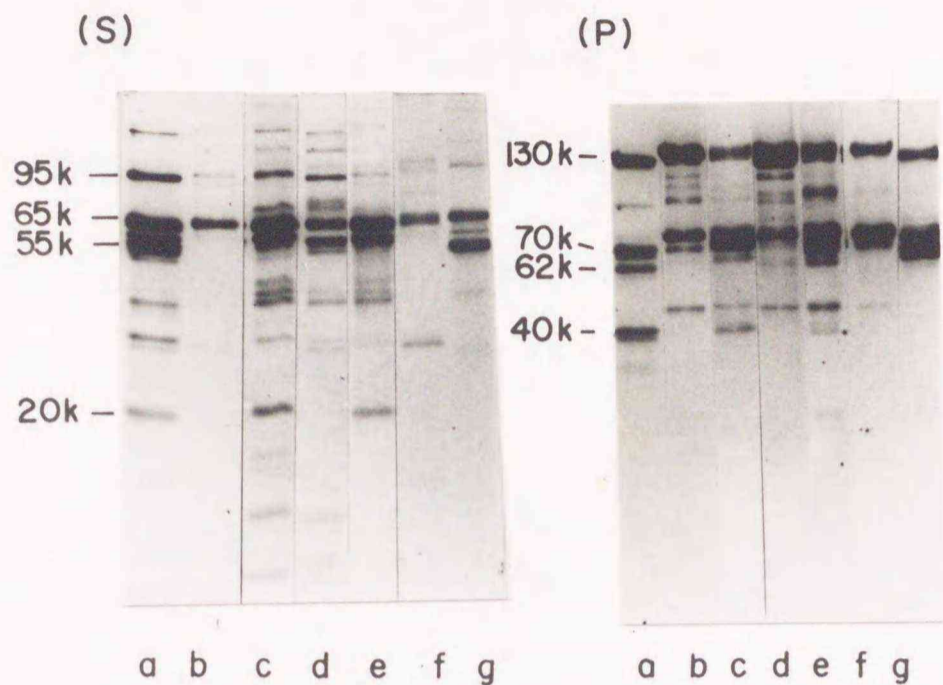


Fig. 26. SDS-PAGE patterns of water-soluble and water-insoluble chymotryptic fragments of various fish rods.

Fish rods in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) were digested by using 1/250 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C and dialyzed against 0.05 M KCl pH 7.0. The dialyzates were centrifuged at 80,000 x g for 60 min. (A) and (B) indicate the supernatant and precipitate, respectively. (a), carp; (b), yellowtail; (c), mackerel; (d), bastard halibut; (e), tuna; (f), tilapia; (g), rabbit.

Table 4. Apparent molecular mass of various fish rods and LMMs.

	rod	LMM (kDa)* <sup>1</sup>		
Carp	130	70	62	40
Yellowtail	140	80	70	47
Mackerel	140	80	70	47
Bastard halibut	140,130	80	-	47
Tuna	140	81	70	48
Tilapia	140	80	-	47
Rabbit	130	72	63	-

\*<sup>1</sup> Molecular mass of the subunits of rod and LMM was measured by SDS-PAGE.

### 第3節 コイ 40k LMM の単離とその構造特性

コイ rod 内部にはキモトリプシン感受性の高い部位が2箇所存在するため、ウサギ rod からは得られないような小さな分子断片が生成した。これらの分子断片を用いて、rod の構造や機能（フィラメント形成能）に関わる rod 分子内の各部分の役割を研究できると考えた。特に 40k LMM は最も短い塩溶性分子断片であり、この分子断片のフィラメント形成能について興味をもたれる。そこで、まず本節では、各 LMM 特に 40k LMM の分離精製について検討した。

#### 1. DEAE-Toyopearl による 40k LMM の単離精製

コイ rod のキモトリプシン消化物の塩溶性画分に含まれる未消化 rod、70k LMM、40k LMM といった LMM 成分をそれぞれ分離するための条件について検討した。まず、rod 消化物の塩溶性画分を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) で溶解した後、ゲル濾過 (Sephacrose CL-4B) に供したが、大きな2つのピークとして溶出された。Fig. 27 にその溶出図形、及び各フラクションの SDS-PAGE から定量した各分量を示す。フラクション No 20、25、29 にピークを持つように、それぞれ rod、70k LMM、40k LMM が溶出されていた。rod は LMM と分離可能であったが、目的の 40k LMM は 70k LMM の溶出位置と重なっていたため、それぞれを分離することはできなかった。

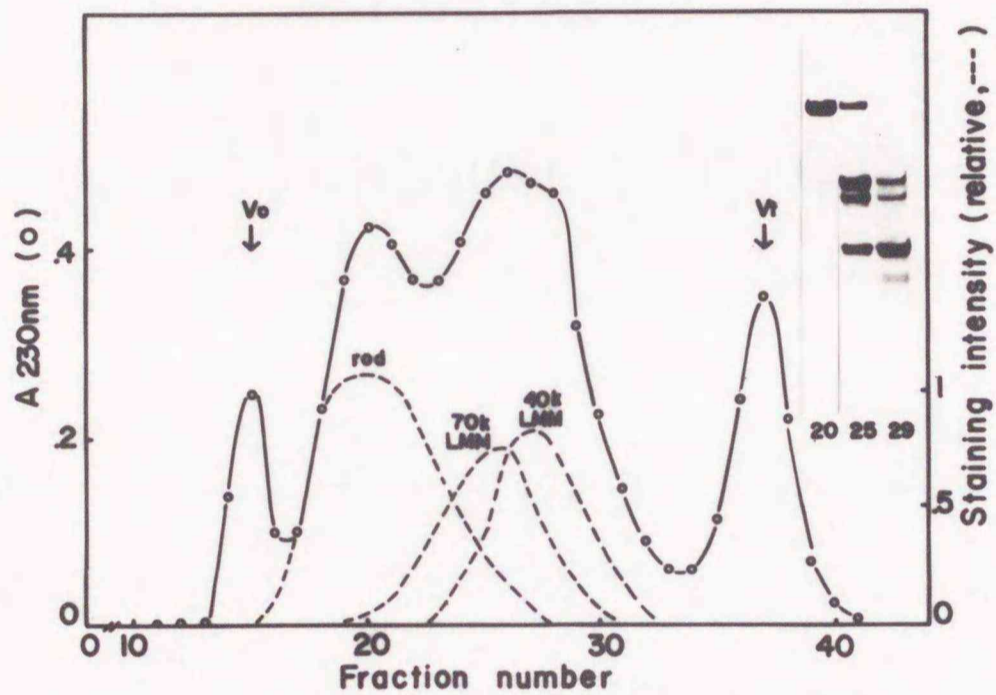


Fig. 27. Sepharose CL-4B chromatography of the water-insoluble fraction of the carp rod digest.

The salt-soluble fraction of the carp rod digest was dissolved in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and the solution was applied to a Sepharose CL-4B column (1.6 x 46 cm) equilibrated with the same buffer. The elution profiles of rod, 70k LMM and 40k LMM (dotted line) were densitometrically estimated from the SDS-PAGE of the fractions. Fraction numbers are shown below the gels.

次に、コイ rod を精製するために用いた DEAE-Toyopearl クロマトグラフィーによる分離を試みた。rod 消化物を 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、5 mM MgCl<sub>2</sub> の条件で遠心分離 (25,000×g, 20分) して、水溶性の S-2 画分を除いた。その後、沈澱を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液で溶解し、続いて 20 mM Na-PPi (pH 7.5) 溶液に透析して溶媒を交換した。そして、同溶液にて平衡化した DEAE-Toyopearl に供し、20 mM から 50 mM までの Na-PPi (pH 7.5) の直線濃度勾配により溶出した。代表的な溶出図型を Fig. 28 に示す。この条件では試料のほとんどが吸着され、Na-PPi の勾配により3つのピークとして分離された。それぞれのピークの構成成分を SDS-PAGE図で調べたところ、23 mM Na-PPi 付近で溶出される第一のピークは 40k LMM のみから成っていた。次に Na-PPi 濃度 35 mM 付近に 62k LMM 及び 70k LMM の混合したピークが溶出されたが、ピークの前半には 62k LMM が、それに遅れて 70k LMM が溶出するようであり、ピークの後半部分をとると 70k LMM しか 検出されなかった。そして 38 mM Na-PPi で溶出される大きなピークは、未消化 rod のものであった。このように 40k LMM、70k LMM をそれぞれ分離生成する事ができた。

ここで用いた DEAE-Toyopearl は陰イオン交換樹脂であるので、吸着し易さからタンパク分子表面の総電荷を推測すると、40k LMM、70k LMM、rod の順に負の電荷が大きいことが示され、特に 40k LMM は負電荷が少ないと推測できた。

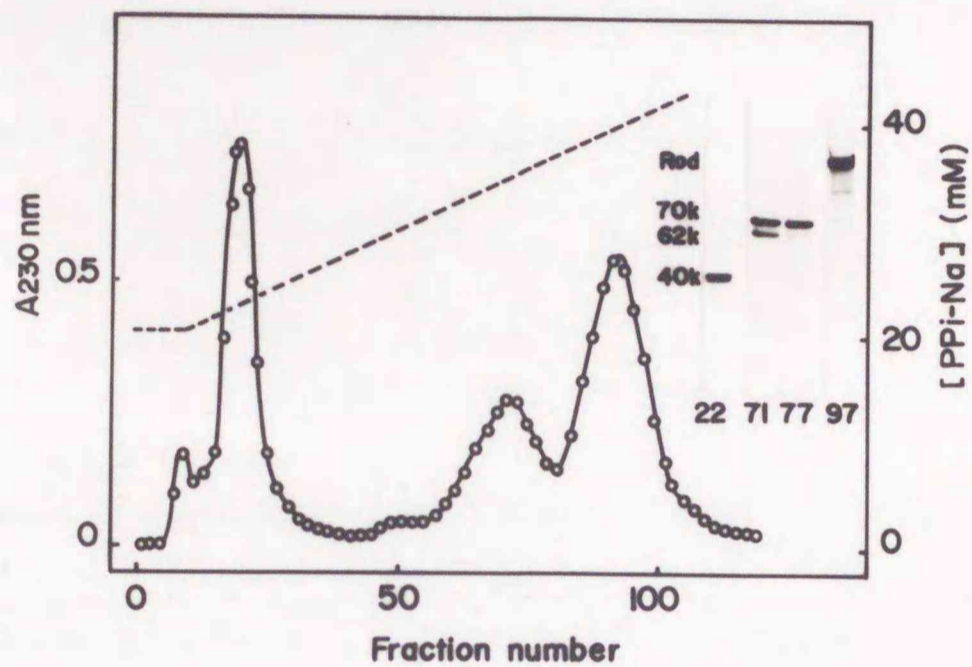


Fig. 28. DEAE-Toyopearl chromatography Separation of carp LMM fraction.

Carp myosin rod was digested by chymotrypsin in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and the water-insoluble fraction obtained was dissolved in 20 mM Na-PPI (pH 7.5) and then subjected to DEAE-TOYOPEARL column chromatography. Proteins were eluted by a linear gradient of Na-PPI concentration (dotted line). The insert indicates the SDS-PAGE patterns of the fractions. Numbers at the bottom of the gel are fraction numbers, and numbers on the side of the gel are molecular mass of the fragments in kDa.

## 2. 40k LMM、70k LMM 及び rod の理化学的特性の比較

40k LMM の分離に成功したので、この構造特性を調べようとした。まず 40k LMM のアミノ酸分析を行い、rod 及び 70k LMM と比較した。その結果を Fig. 29、Table 5 に示す。アミノ酸組成のスターダイヤグラムは三者ともによく似た形を示し、全体的な組成にはあまり差はないようであった。rod の $\alpha$ -ヘリックス含量が 100 % であることを前に述べたが、この構造を保持するための基本的なアミノ酸組成は共通しているように思われた。なお、40k LMM は Trp と Phe を含んでいなかった。

Table 5. Amino acid compositions of rod, 70k LMM and 40k LMM from carp.

Amino acid	rod	70k LMM	40k LMM
Aspartic acid* <sup>1</sup>	8.9 (93)* <sup>2</sup>	9.1 (51)* <sup>2</sup>	9.5 (31)* <sup>2</sup>
Threonine	3.6 (37)	3.6 (20)	3.4 (11)
Serine	4.8 (50)	4.6 (26)	4.1 (13)
Glutamic acid* <sup>1</sup>	26.4 (274)	25.9 (145)	24.8 (79)
Proline	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Glycine	2.5 (26)	3.0 (17)	3.7 (12)
Alanine	9.4 (98)	9.5 (53)	9.6 (31)
Cysteine	0.3 (3)	0.3 (2)	0.3 (1)
Valine	4.3 (44)	5.6 (31)	7.2 (23)
Methionine	2.5 (26)	2.6 (14)	3.4 (11)
Isoleucine	3.0 (31)	2.5 (14)	1.6 (5)
Leucine	11.1 (115)	10.7 (60)	10.2 (33)
Tyrosine	0.8 (8)	1.1 (6)	1.0 (3)
Phenylalanine	0.8 (8)	0.5 (3)	0.2 (0)
Lysine	12.2 (127)	11.0 (61)	10.3 (33)
Histidine	1.4 (15)	1.9 (10)	2.0 (6)
Tryptophan	0.2 (2)	0.2 (1)	0.05(0)
Arginine	5.9 (61)	6.5 (36)	7.7 (25)
Total	100.0(1040)	100.0(560)	100.0(320)

\*<sup>1</sup> Aspartic and glutamic acids including asparagine and glutamine, respectively.

\*<sup>2</sup> The numbers in parenthesis indicate mols of the residues in a mol of each product.

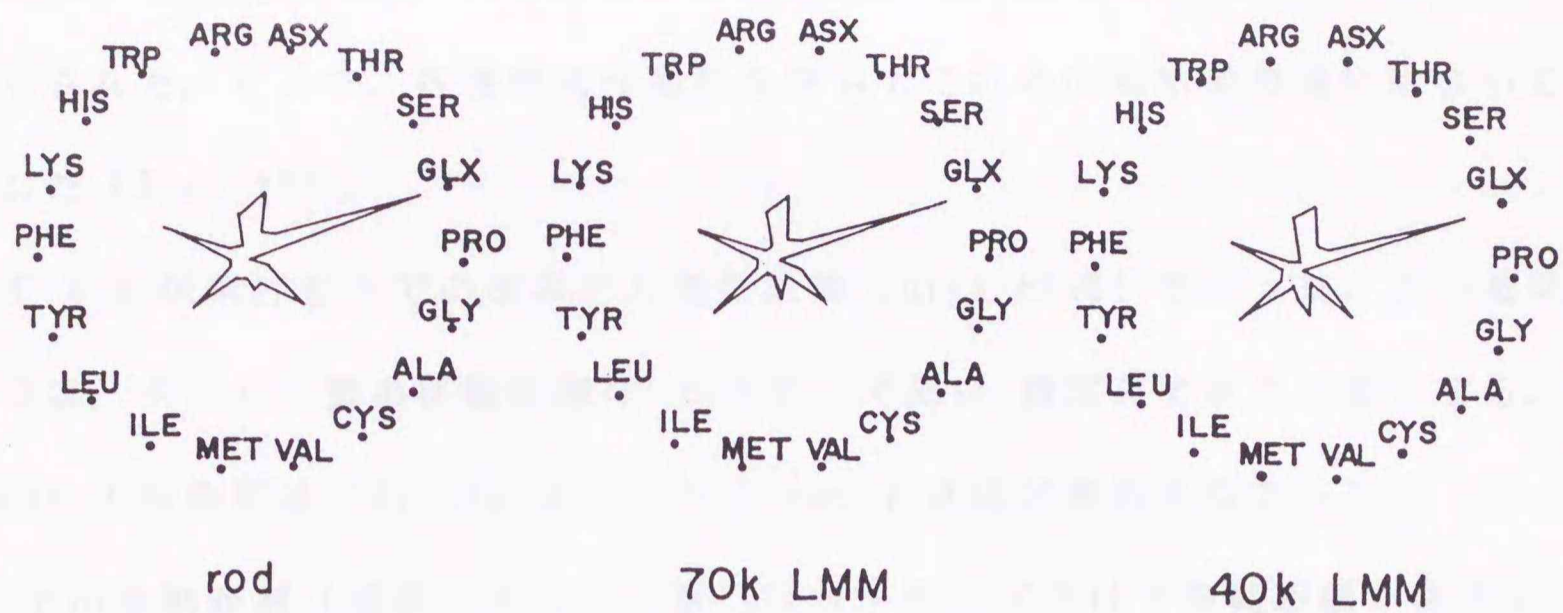


Fig. 29. Star diagrams of the amino acid compositions of carp rod, 70k LMM and 40k LMM.

The diagrams were made by using the amino acid compositions in Table 5.

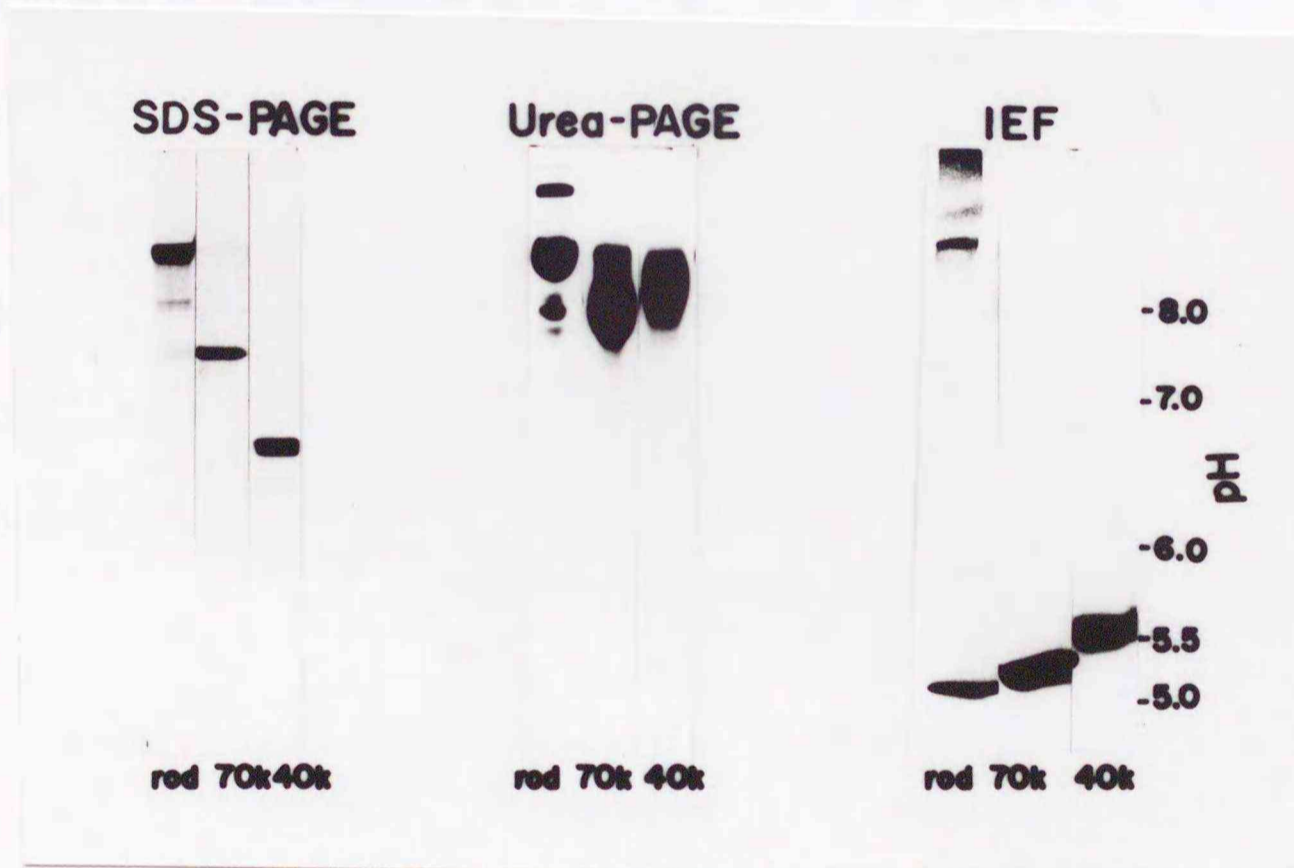


Fig. 30. SDS-PAGE, urea-PAGE and isoelectric focusing of carp rod, 70k LMM and 40k LMM.

SDS-PAGE and urea-PAGE were carried out by using 10 % polyacrylamide gel containing 0.1 % SDS and 4 % polyacrylamide gel containing 8 M urea, respectively. Isoelectric focusing (IEF) was conducted by using 3.9 % polyacrylamid gel containing 8 M urea and 2 % ampholine (pH 3-10.5).

Fig. 28 で示した DEAE-Toyopearl 溶出位置から、LMM、rod の総電荷が異なる事が示された。そこで、各種電気泳動法を用いてこれらの総電荷の違いについて検討した (Fig. 30)。

先ず 8 M 尿素存在下での尿素ゲル電気泳動 (urea-PAGE) を行った。この電気泳動では、タンパク質の移動距離は分子サイズ及び総電荷で決まる事になる。40k LMM の移動度は 70k LMM より小さく rod とさほど変わらなかった。SDS-PAGE 上の泳動距離 (通常のタンパク質では分子サイズだけで移動距離が決まる) と比較すると、40k LMM はそのサイズの割に泳動され難いことが判る。よってこの方法でも 40k LMM 分子は負電荷量が少ないと推測された。

更に、等電点電気泳動 (IEF) を行ったところ、パターンは少し乱れているものの、三者の等電点は明らかに異なっていた。40k LMM のそれは 5.5 であり、70k LMM の 5.2、rod の 5.1 より高い等電点を示した。Urea-PAGE 及び IEF は 8 M 尿素存在下で行っているので、蛋白の立体構造が破壊されている状態での電荷を見ていることとなり、立体構造を保った分子の表面電荷を示してはいない。しかし、この結果は DEAE-Toyopearl への吸着しにくい性質一致しており、40k LMM 分子表面の負電荷が少ないという推測を裏づけた。

#### 第4節 小考察

この章では、プロテアーゼ消化法を用いて、すなわち消化様式が基質タンパク質の立体構造を敏感に反映する事実に基づいて、魚類ミオシンの分子内構造を哺乳動物（ウサギ）ミオシンのそれと比較する事を試みた。そのために、コイ・ミオシン分子におけるキモトリプシン切断部位及び消化生成物をウサギ・ミオシンの場合と比較しながら検討した。

まず第1節では、コイ・ミオシンの S-1/rod junction での消化特性について検討したところ、ウサギ・ミオシンでは、この部位での切断は  $\text{Ca}^{2+}$  で完全に阻止されるが、コイ・ミオシンでは高濃度の  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも切断は完全に阻止されず、更に広範な消化条件（pH 6.3~8.3、0.05~0.3 M KCl、10~25 °C）下でも起こった（図示せず）。またキモトリプシンの代わりにトリプシンを用いて  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で消化を行っても S-1（S-1（Ca））が生成されることを消化物のゲル濾過分析により確認した。よって、コイ・ミオシンの S-1/rod junction の切断が  $\text{Ca}^{2+}$  で阻止できないのは、消化条件やプロテアーゼの種類に起因しているのではなく、基質であるコイ・ミオシンの構造に起因していると結論した。

$\text{Ca}^{2+}$  存在下も S-1/rod junction で切断される原因として、コイのミオシンにはアイソザイムがあるという可能性も考えられた。すなわち、ウサギ・ミオシンと同様に  $\text{Ca}^{2+}$  によって S-1/rod junction の切断が阻止されるコイ・ミオシンと  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも切断されるコイ・ミオシンが混合していて、前者のミオシンから S-1、後者のミオシンから HMM がそれぞれ生成することも考えられた。ところが、 $\text{Ca}^{2+}$  中での消化物から Sepharose CL-4B ゲル濾過で分離した HMM を 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$  存在下で更にキモトリプシン消化しても、S-1 が生成したので、アイソザイムの

存在に否定的な結果が得られた。よって、コイ・ミオシンの S-1/rod junction は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でも切断がおこりやすいような、脆弱な構造をしていると考えられる。

イカやホタテのミオシンの場合は  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でキモトリプシン消化する事により、制御軽鎖（骨格筋の DTNB-LC に相当する）をもった Ca-S-1 が生成することが知られている（Kamiya, *et al*, 1985）。コイ S-1 (Ca) の軽鎖組成についても尿素ゲル電気泳動と組み合わせた二次元電気泳動により検討を行ったが（図示せず）、DTNB-LC やその断片は含まれていなかった。コイ HMM 画分中には、部分分解を受けた DTNB-LC が含まれていたため、S-1 が生成されるためには DTNB-LC が消失することが必須であり、コイ・ミオシンの S-1/rod junction もウサギ同様 DTNB-LC によって保護されていると結論した。

コイ・ミオシンの DTNB-LC の  $\text{Ca}^{2+}$  結合能は測定していないが、S-1 の生成の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度依存性から判断すると、DTNB-LC と  $\text{Ca}^{2+}$  の見かけの親和性はウサギのそれにくらべ 1/100 程度であると推定される。ただし、 $\text{Ca}^{2+}$  濃度が充分高い条件でも切断が起こる事から、 $\text{Ca}^{2+}$  を結合した DTNB-LC そのもののキモトリプシン感受性が高く小断片化して消失するために、この junction を保護できないのか、あるいは DTNB-LC とミオシン HC との相互作用が弱い為にこの junction が保護されないことが推定される。すでに、魚類 S-1 はウサギ S-1 とは異なり、加熱変性させるとアルカリ軽鎖が HC から容易に遊離することが見いだされているので（山本ら、1989；浜井ら、1989；Hamai & Konno, 1990）、アルカリ軽鎖のみならず DTNB-LC の結合能も劣っていると推測できる。

さらに、コイ・ミオシン単量体のキモトリプシン消化実験から、コイ・ミオシンの rod 部分にはウサギ・ミオシンと同様の HMM/LMM junction の他に、特殊

な切断部位が存在することが示唆されたので、第2節では単離した rod を用いて比較検討し、その内部構造上の特徴を明らかにしようとした。

まずミオシンから rod を精製する事を試みた。魚類ミオシンが一般的に不安定なことを考慮して、ウサギ rod 調製で用いられているエタノール変性法を使わず、DEAE-交換体を用いたクロマトグラフィーによって精製した。このクロマトグラフィーによるミオシンと rod の分離はあまりよくなかったが、粗 rod 中の残存ミオシン量を少なくすると純度の高い rod を比較的高い収量で得る事ができ、また LMM を除く事もできた。

ただ、この方法の短所は調製に若干時間がかかる点と、大量調製が困難な点であった。ミオシンを調製すること自体が難しい様な不安定な魚種からも rod を調製する必要がある場合のことを考えると、より迅速な調製方法の開発が必要である。更に、ミオシンの形成するフィラメントの構造が弱いと rod 内部でも消化を受けるので（加藤、今野、1990）、フィラメント形成能の劣る魚種の場合はミオシンを消化して rod を得る方法の適用は難しいと予想される。そこで、次に筋原線維から直接 rod を調製する事を試みた。出発材料を筋原線維としたときの利点は、① 筋原線維は簡単に短時間で調製でき、かつ大量調製も可能である点、② ミオシンより安定なので、不安定な魚種からも調製できると考えられる点、③ 筋原線維中でのミオシンフィラメントの構造はどの魚種でも同様に強いこと（松浦、新井、1987）、④ クロマトグラフィーで rod と分離のよくないミオシンを、硫酸分画法により簡単に除去できる点、などである。筋原線維の消化条件が良くないときには少量の LMM が混入している場合があったが、高い純度が必要なときにはクロマトグラフィーで更に精製する事が可能であった。なお、ミオシンから調製した rod と、筋原線維から調製した rod の物理的性質、キモトリプシン消化

性、及び後述するフィラメント形成能を調べたところ、全く同じであった。

実際、この方法によりミオシンのフィラメント形成能の劣るといわれているテ  
ィラピア（松浦、新井、1985）や不安定なヒラメなどの魚からも rod の調製が可  
能であった。調製した rod のサブユニットの分子サイズは魚種によって異なり、  
コイ以外の魚種の rod のサブユニットはいずれも SDS-PAGE上で 10kDa 程大きか  
った。ウサギやニワトリミオシンにおいては、その C 末端の58残基のアミノ酸部  
分はプロテアーゼによって切断されるため、キモトリプシン消化により得られる  
rod はこの部分を欠いていることが明らかとなっている（Maita, *et al.*, 1991;  
Elzinga & Trus, 1980; Trus & Elzinga, 1981）。コイ rod はウサギ rod と同  
じサイズであるので同様の切断が起こっているが、他の魚類ではそのような切断  
が起こっていないと思われる。コイ以外の魚は活魚として手に入れることができ  
ず、冷蔵や冷凍肉から筋原繊維及び rod を調製したのでこのことも原因のひとつ  
かもしれない。

単離調製したコイ rod の構造についてウサギ rod と比較検討した。アミノ酸  
組成は良く似ていた。また、完全な $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていること、ゲル  
濾過分析、超遠心分析、固有粘度測定などからその分子量、分子形に差はないこ  
とが判った。このような基本的な構造はコイ rod もウサギ rod と全く区別でき  
なかったが、キモトリプシン消化法によって両 rod の内部構造がかなり異なる事  
が明らかになった。コイ rod 分子上には HMM/LMM junction の他に 95k S-2/  
40k LMM junction という新たな切断部位が存在していた。そして、この部位での  
切断によって、95k S-2 と 40k LMM という特殊な断片が生成した。ウサギ rod  
中での HMM/LMM junction 部分は局所的に $\alpha$ -ヘリックスがほぐれているために  
キモトリプシンで切断されると推定されているが、コイ rod 内の 95k S-2/40k

LMM junction の構造も同じようにほぐれていると思われる。

この 95k S-2/40k LMM junction の切断のされ易さは、rod と 70k LMM で異なっており、rod では切断され易いが、70k LMM ではされにくかった (Fig. 23)。分子運動が junction の柔軟性に影響すると考えると、rod の方が 70k LMM より長いから、この junction がフレキシブルとなるが、70k LMM の様に短くなるとフレキシブルでなくなって、切断を受け難くなると推測した。このため、rod の消化時に一旦 70k LMM が生成してしまうと、そこから 40k LMM への切断は起こり難くなるので 40k LMM は初期に生成するがそれ以上あまり増えない事実を説明できた。一方、HMM/LMM junction は 95k S-2/40k LMM junction よりも感受性が高いので、95k S-2 は HMM/LMM junction で更に消化を受ける。

なお、コイ rod にはこれらキモトリプシン感受性の高い部位の他にも数カ所の部位で切断を受ける可能性があるが、その部位の特定はできなかった。まず、55k S-2 は 65k S-2 から生成していることは確かであるが、C 末端と N 末端のどちらの側で切断を受けるかは判らなかつた。同様に 62 k LMM は 70k LMM に由来しているがどちらが欠けたものかは未同定である。しかし、これまでウサギ rod 内の HMM/LMM junction もいくつかの切断部位が集まった junction であることがわかっているから、S-2 については C 末端、LMM については N 末端が欠損していると考えてよさそうである。また、33 kDa フラグメントは LMM に由来していることは確かめ、40k LMM の小断片化したものと思われたが断定できなかった。

第3節では、コイ rod から精製した 40k LMM の精製を試みた。その結果、ピロリン酸存在下での DEAE-Toyopearl によって rod、70k LMM、40k LMM を分離する事が可能であった。

これら rod、70k LMM、40k LMM のアミノ酸組成は大まかには似ており、いずれも完全な $\alpha$ -ヘリックス構造であることを考えると当然であるように思えた。ウサギ rod のアミノ酸配列によると、Trp は S-2部分にはなく HMM/LMM junction 及び、LMM の N 端側に、Tyr は LMM の N 端側及び、C 末端側に局在している (King & Lehrer, 1989; Maeda, *et al.*, 1987)。よって、ウサギ rod 中の 40k LMM に相当する部分には Trp と Phe は存在しないこととなり、コイ 40k LMM で得た結果と一致している。なお、Fig. 31 にコイ rod、70k LMM、65k S-2 のスペクトルを示すが、S-2 に 280 nm の吸収のピークが認められない。

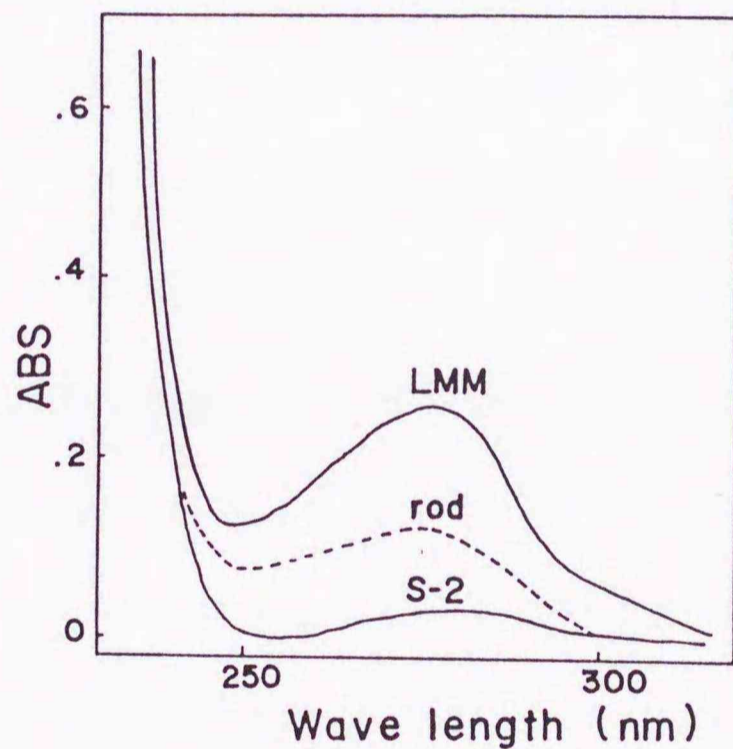


Fig. 31. Absorption spectrum (ABS) of carp rod, LMM and S-2.

Carp rod, 70k LMM and S-2 (1.2 mg/ml) were dissolved in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).

rod 分子の各部分によって総電荷が異なっている事が示唆された。IEF は尿素存在下で行ったので、native な状態の等電点と一致するとは限らないが、DEAE-Toyopearl 溶出位置から判断しても 40k LMM は分子表面の負電荷が少ない部分であると結論した。また 40k LMM と 70k LMM の総電荷はかなり異なるのに対し、70k LMM の DEAE-Toyopearl 溶出位置は rod に近いことから、70k LMM の N 端の 20 kDa 部分に負電荷が集中していると予想できた。この予想は、コイ rod 消化物中に含まれる 20k フラグメントの DEAE-Toyopearl 溶出位置が 70k LMM とほぼ同じであったことから支持された (図示せず)。

## 第2章 ミオシン尾部のフィラメント形成能に関わる分子内構造の研究

ミオシンは生理的イオン強度下で自己集合しフィラメントを形成する機能（フィラメント形成能）を有しているが、rodがこの機能を担っている事は周知の事実である。さらにrodのカルボキシル末端側の約半分を占めるLMMがフィラメント形成する最小のものだが、LMM内のどの部分がどのような形でフィラメント形成に関わっているのかという事はよく知られていない。これまでウサギrodやLMMをトリプシンで消化し、生成フラグメントの低イオン強度溶液への溶解性を検討したところ、C末端部分を欠いたフラグメントが塩溶性の性質を失い、フィラメント形成にrodのC末端部分が重要であると推定した報告がある（Nitray, *et al.*, 1983）。しかし、実際にLMMから分子断片を単離して調べた例はなく、rodやLMMの分子内構造とフィラメント形成能のはっきりした関係はあまり理解されていない。

前章において、コイrodをキモトリプシン消化することによって、40k LMMという最小の塩溶性の分子断片が生成することを示した。そして、この40k LMMはrod及びLMMのC末端部分に位置することも明らかにした。本章ではこの40k LMMのフィラメント形成能を検討し、この部位の機能特性を見つけようとした。また、そのフィラメント形成能をrodやLMMのものと比較検討することで、rod分子内の各分子断片においてどのような機能分担がなされているかも明らかにしようとした。

ミオシンやrodのフィラメント形成能はイオン強度（KCl濃度）やpH、及びMg<sup>2+</sup>、ATP・Mgなどの影響を受けることが知られており、KCl濃度やpHが低い方がフィラメント形成し易く（Harrington & Himmelfarb, 1972; Bertel, *et al.*,

1984; Godfrey & Harrington, 1970 a, b)、また、 $Mg^{2+}$ が存在しているとフィラメント形成は促進されると報告されている (Reisler, *et al.*, 1983)。本章ではフィラメント形成時におけるこれらの要因 (pH、 $Mg^{2+}$ ) の作用についても、rod の分子内構造と関連づけて検討した。

## 第1節 40k LMM ドメインのフィラメント形成能の特性

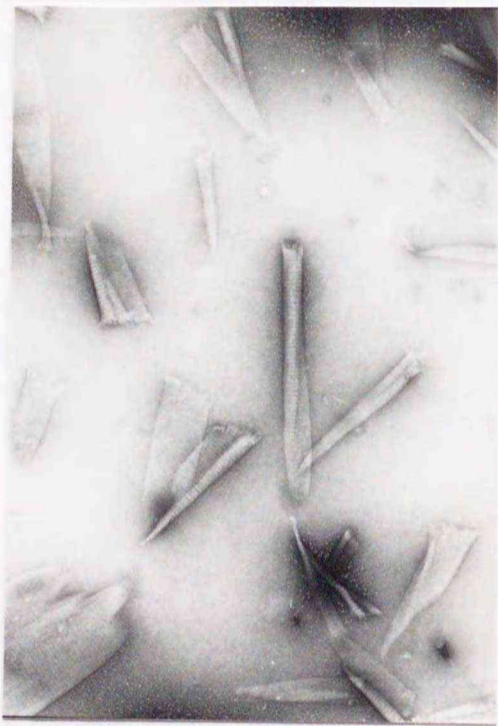
### 1. コイ 40k LMM のフィラメント形成能

#### (1) コイ 40k LMM の形成する分子集合体の電子顕微鏡観察

まず、コイ rod、70k LMM 及び 40k LMM が形成する分子集合体の形状を電子顕微鏡観察し、比較検討した。40k LMM 及び 70k LMM は rod 消化物の塩溶性画分から DEAE-Toyopearl によって分離精製した。

0.3 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) に溶解している 40k LMM (タンパク濃度 約 0.8~1 mg/ml) に 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液を少しずつ段階的に加えていき、5 分ほどかけて KCl 濃度を 0.1 M もしくは 0.075 M まで希釈した (この希釈法を段階希釈法と呼ぶ)。こうして形成させた 40k LMM 集合体を 1% あるいは 2% 酢酸ウランでネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。その電子顕微鏡写真を Fig. 32 に示す。

(A)



(B)



—  
0.5  $\mu$ m

Fig. 32. Electron micrographs of the carp 40k LMM paracrystal.

40k LMM in 0.3 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) was diluted with 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) to give final KCl concentration of 0.075 M (A) and 0.1 M (B), and paracrystals formed were observed by electron microscope.

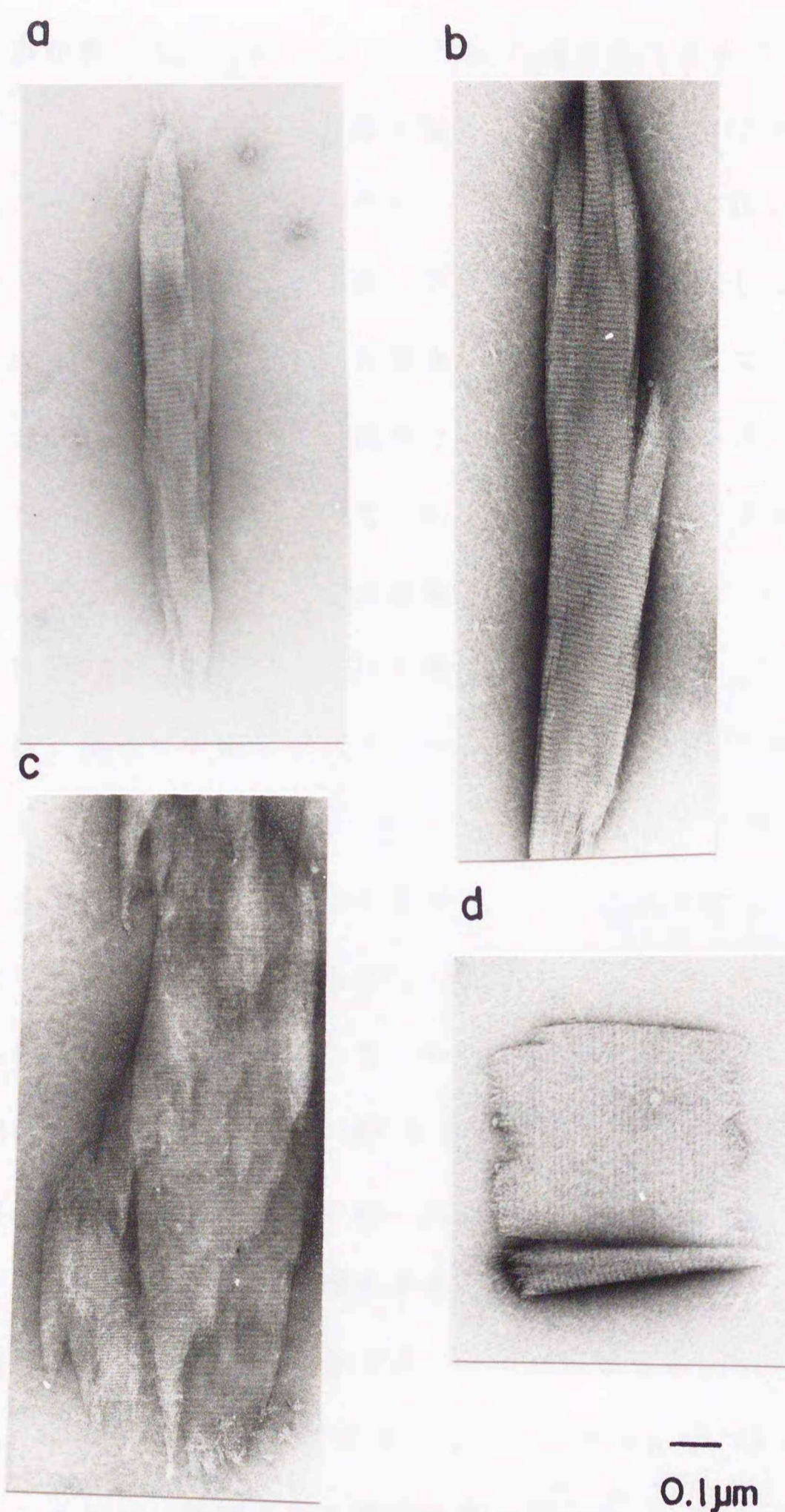


Fig. 33. Electron micrographs of the carp 40k LMM paracrystal.

High magnification images of the 40k LMM paracrystals formed at 0.075 M KCl, pH 7.0. a-d show different shapes of the paracrystals.

40k LMM 集合体の表面には縞に見える周期性が観察され、パラクリスタルを形成している事が判った。このため 40k LMM は塩溶性であるだけでなく、低イオン強度溶液下で規則正しく配列して分子集合体を形成する、フィラメント形成能を有していることを確認した。パラクリスタルの多くは幅の広いシート状であったが、スピンドル型のものも観察され、2つのタイプが存在しているようだった。また、0.1 M KCl (B) で形成させた場合、巨大なパラクリスタルの他に非常に細く短いフィラメント様の集合体が観察できた。この集合体は 0.075 M KCl (A) 条件下では余り観察されなかったもので、0.1 M KCl でパラクリスタルになりきれない、小さな集合体と思われた。この結果から、40k LMM の分子集合能は微妙な KCl 濃度の影響を受けやすいことが示唆された。

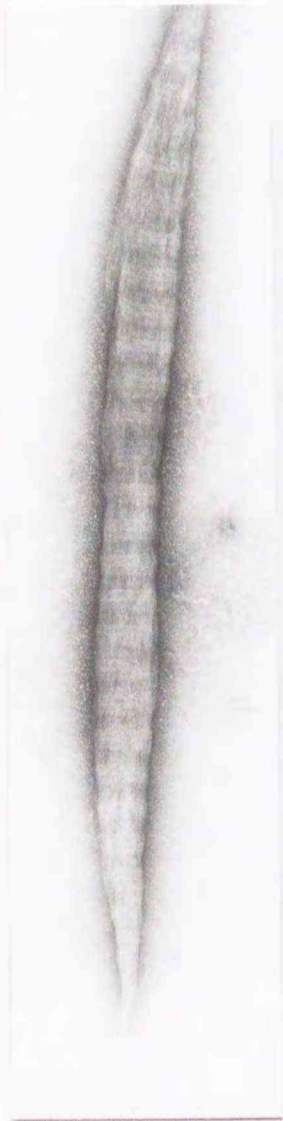
0.075 M KCl 条件下で観察されたパラクリスタルの高倍率写真を Fig. 33 に示す。スピンドルタイプ (a) やシートタイプが中心であったが、スピンドルタイプが集まってシートを作っているような両タイプの間接的なもの (b)、幅広いシートが幾重にも重なりあっているもの (c)、またシートの幅が非常に広く、長さよりもむしろ横幅の方が大きいようなシートタイプ (d) も多く観察できた。このことから、40k LMM は side-by-side に集合し易い分子である事が知られた。このように形成したパラクリスタルの形、大きさはあまりにも不規則であったので、幅や長さを測定して統計的に処理をする事はできなかった。いずれのパラクリスタルの表面にも周期性が確認できたが、その周期幅を測定したところいずれも約 13 nm であった。また、(c) に示すパラクリスタルには 13 nm の周期が更に 2 分割され、より細かい周期を示す部分もあった。

(A)

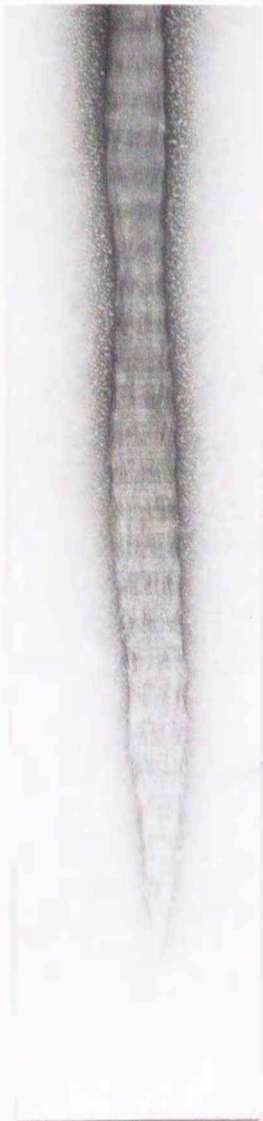


0.5  $\mu$ m

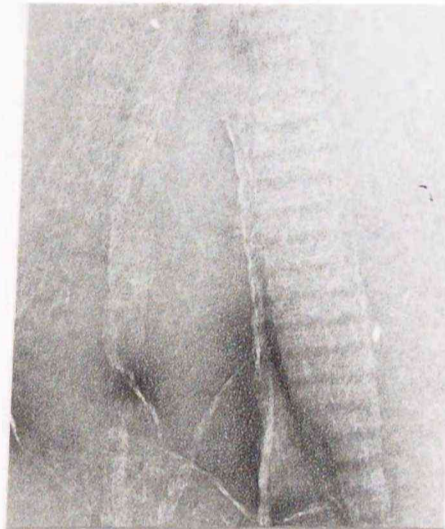
(B) a



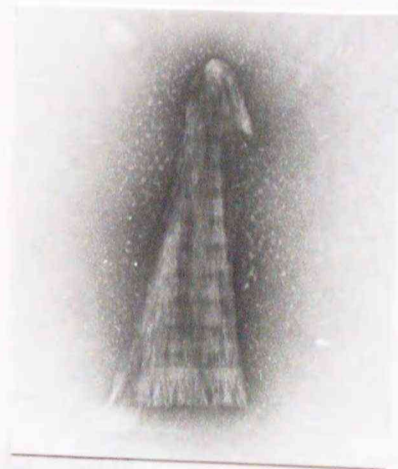
b



c



d



0.1  $\mu$ m

Fig. 34. Electron micrographs of the carp 70k LMM paracrystal.

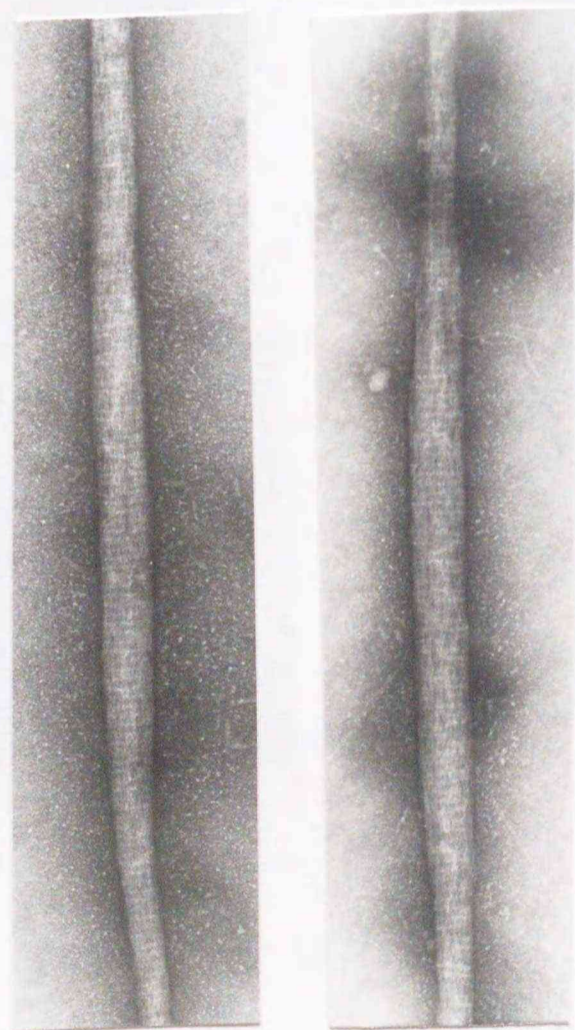
70k LMM paracrystal was allowed to form as in Fig. 32. Low (A) and high (B) magnified images of the paracrystals. a-d show different shapes of the paracrystals.

(A)



—  
0.5 $\mu$ m

(B)



—  
0.1 $\mu$ m

Fig. 35. Electron micrographs of the carp rod filament.  
Carp rod filament was allowed to form as in Fig. 32.  
Low (A) and high (B) magnified images of the filaments.

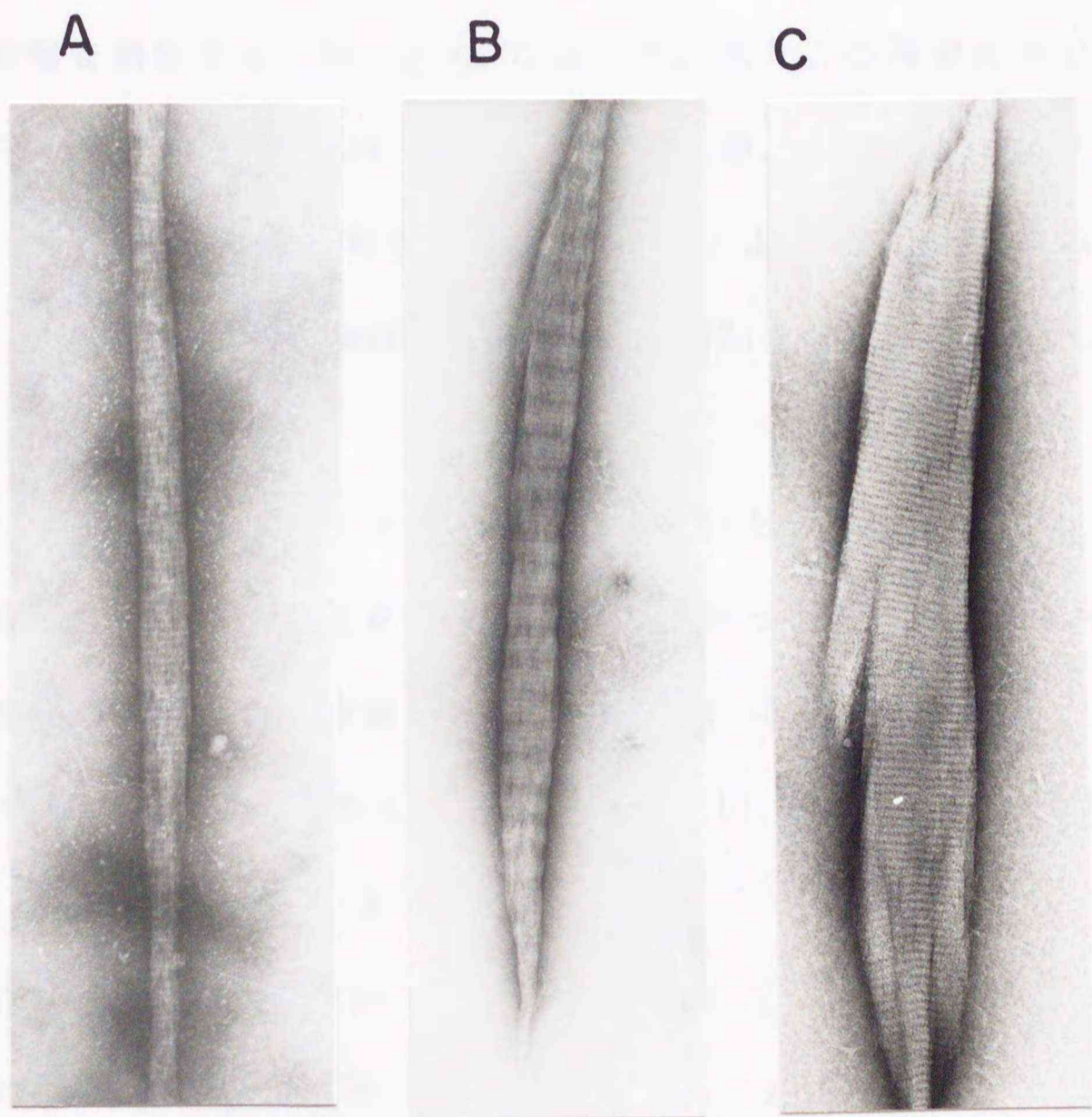


Fig. 36. Comparison of electron micrographs among the 40k LMM, 70k LMM and rod paracrystals.  
 (A), rod; (B), 70k LMM; (C), 40k LMM.

40k LMM の場合と同じ希釈法により、0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 条件下で形成させた rod 及び 70k LMM の集合体の形態を電子顕微鏡により観察した。70k LMM (Fig. 34) の場合は、シート状、スピンドル型の2タイプのパラクリスタルが観察されたが、それらの形、大きさはかなり均一であり (A)、また 40k LMM が形成していたような非常に横幅の広いシートタイプは観察されなかった。ほとんど全てのパラクリスタルには周期性が観察でき、高倍率 (B) にしてその周期幅を測定すると約 43 nm であった。またこの周期の中でも更に細かい周期がみられる場合 (Fig. 34 B-a,b) もあったが、これらパラクリスタルの周期及び形態は ウサギ LMM で報告されているのとよく似ていた (Huxley, 1963; Chourashi & Pepe, 1977; Katsura & Noda, 1973; Bennet, 1981; Lowey, *et al.*, 1967)。

一方、rod は細長いフィラメントを形成していた (Fig. 35 A)。また、LMM の場合とは異なり表面に周期性を示すものは少なかった。周期性の見られるパラクリスタルを倍率を高くして観察したところ (Fig. 35 B) その幅は約 14 nm であり、ウサギ rod の場合で知られている値 (14.3 nm) とほぼ同じであった (Huxley, 1963; Chourashi & Pepe, 1989)。

なお、これら 40k LMM、70k LMM 及び rod のパラクリスタルを比べてみると (Fig. 36)、その形態、周期、表面構造はそれぞれに異なっていた。特にパラクリスタルの幅が異なり、rod よりも 70k LMM、70k LMM よりも 40k LMM の方が横幅の広い集合体を形成する傾向にあった。特に 40k LMM の場合は非常に幅広いシートタイプを形成し易く、このことから 40k LMM 分子は side-by-side に結合し易いことが推測できた。

これら電子顕微鏡観察の結果により、40k LMM 分子は低イオン強度下で規則正

しく配列して会合する事が確かめられたので、この 40k LMM がミオシンのフィラメント形成ドメインであること、すなわち rod の C 末端 40 kDa の部分がフィラメント形成能を担っていると結論した。

(2) 40k LMM のフィラメント形成能に及ぼす KCl濃度、pH、 $Mg^{2+}$ の影響

次に各種条件下での 40k LMM の分子集合能を 70k LMM や rod と比較する事にした。電子顕微鏡観察により、rod や 70k LMM、40k LMM の集合体の形態は互いに異なり、特に 40k LMM の形成するパラクリスタルの形態は様々であった。そのため、電子顕微鏡による形態観察により、分子集合能を直接比較する事は難しいと思われ、別の指標を用いる事にした。フィラメントやパラクリスタルの懸濁液の濁度を集合能の指標として用いることとした。そこでフィラメント及びパラクリスタル形成時の各種条件を変えたときの集合能（以降両者を区別せずにフィラメント形成能と呼ぶ）を懸濁液の 350 nm での光散乱強度測定によって調べる事とした。

先ずフィラメント形成時の KCl 濃度の影響について検討した。rod、70k LMM、40k LMM (0.3 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)) を KCl 終濃度が 0.03~0.15 になるように 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液中に瞬間的に希釈してフィラメントを形成させた（以降、瞬間希釈法と呼ぶ）。このときのタンパク質の終濃度は全て 0.2 mg/ml となるようにした。希釈後水冷中で30分ほど放置した後懸濁液の光散乱強度を測定した (Fig. 37)。その結果 rod、70k LMM は良く似た値及び変化を示しているのに対し、40k LMM は大きく異なる挙動を示した。特に低 KCl 濃度の時の 40k LMM の濁度は非常に高く、そのフィラメント形成能が優れている事が示された。また、40k LMM は KCl 濃度上昇に伴い大きな濁度変化が見られ、0.06~0.09 M の KCl 濃度範囲で急激な濁度低下が認められた。この KCl 濃度範囲では 70k LMM や rod は緩やかに低下したが、0.1 M KCl における濁度を比べると、40k LMM よりもむしろ高い値を示した。これは 40k LMM が

0.1 M KCl 条件下でパラクリスタルになりきれない微少な集合体を作っているとの結果と一致している。すなわち 40k LMM の集合能は本質的には集合し易いが、KCl 濃度（イオン強度）の影響を受け解集合し易い性質を有していると思われた。

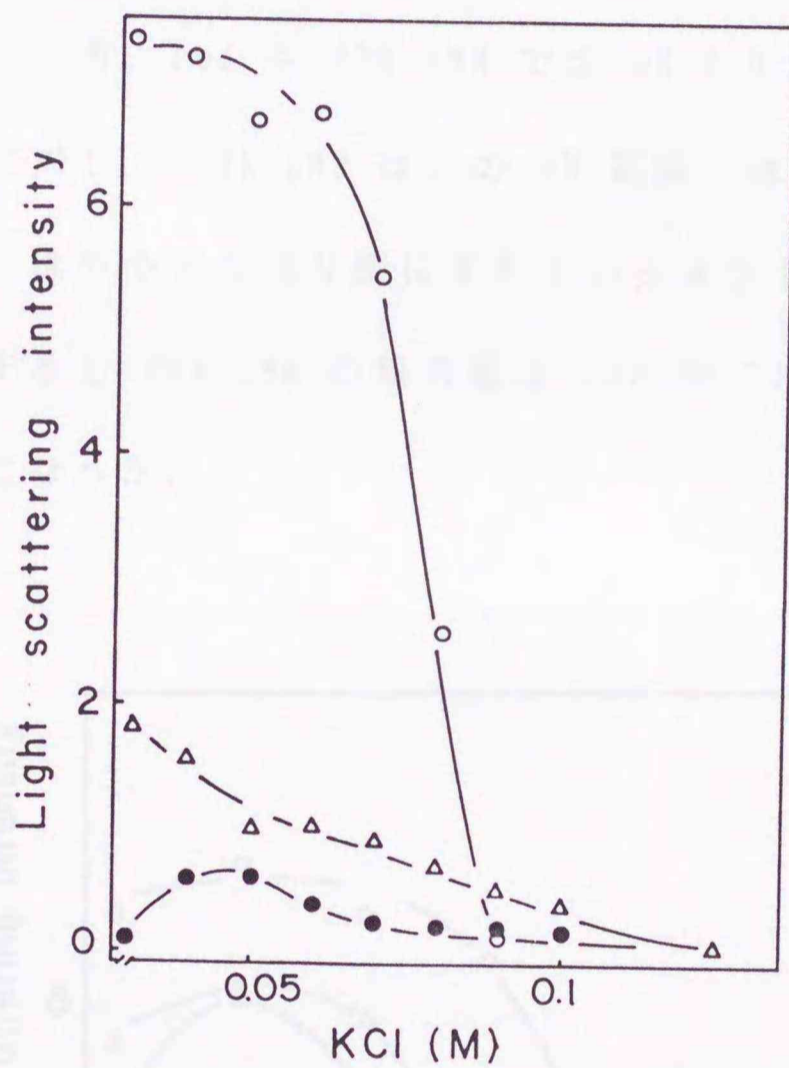


Fig. 37. Effect of KCl concentration on the light scattering intensity of rod, 70k LMM and 40k LMM suspensions.

Rod (●), 70k LMM (Δ) and 40k LMM (○) from carp myosin were suspended in a medium of various concentrations of KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) at 0.2 mg/ml. The light scattering intensity of the suspension was measured at 350 nm at 90° angle.

次にフィラメント形成に及ぼす pH の影響について検討した。40k LMM、70k LMM、rod は KCl 濃度が 0.075 M となるように 20 mM Tris-maleate (pH 5.5~7.0) あるいは 20 mM Tris-HCl (pH 7.5~8.0) 溶液中に瞬間希釈し、フィラメントを形成させた。その結果を Fig. 38 に示すが、3者とも似た変化をしており、pH が低いときの濁度は高いが、pH の上昇に伴い濁度が低下していくという pH 依存性を示した。しかし、40k LMM はいずれの pH でも rod や 70k LMM より高い濁度を示していた。一方、rod や 70k LMM では pH 6.0~7.0 で大きな濁度変化が起こっているのに対し、40k LMM はこの pH 範囲では余り濁度変化はみられず、変化の起こる pH はややアルカリ側にずれているようであった。このため、特に pH 7.0 で比較すると 40k LMM の集合能は rod や 70k LMM に比べ非常に優れているという結果になった。

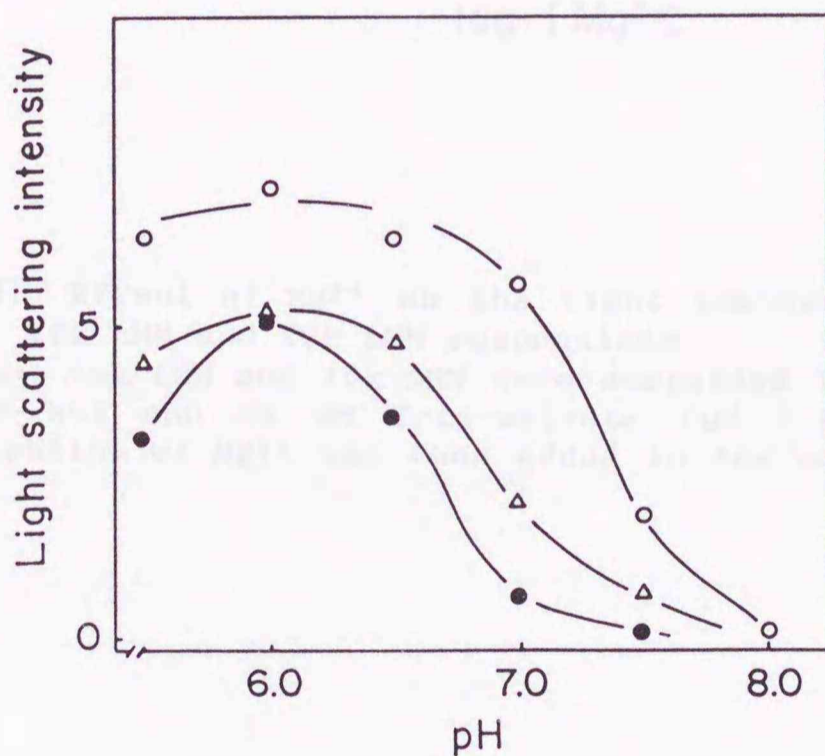


Fig. 38. Effect of pH on light scattering intensity of carp rod, 70k LMM and 40k LMM suspensions.

Light scattering intensities of the suspensions were measured in a medium of 0.075 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 5.5-7.0) or 20 mM Tris-HCl (pH 7.5 and 8.0). Symbols are the same as in Fig. 37.

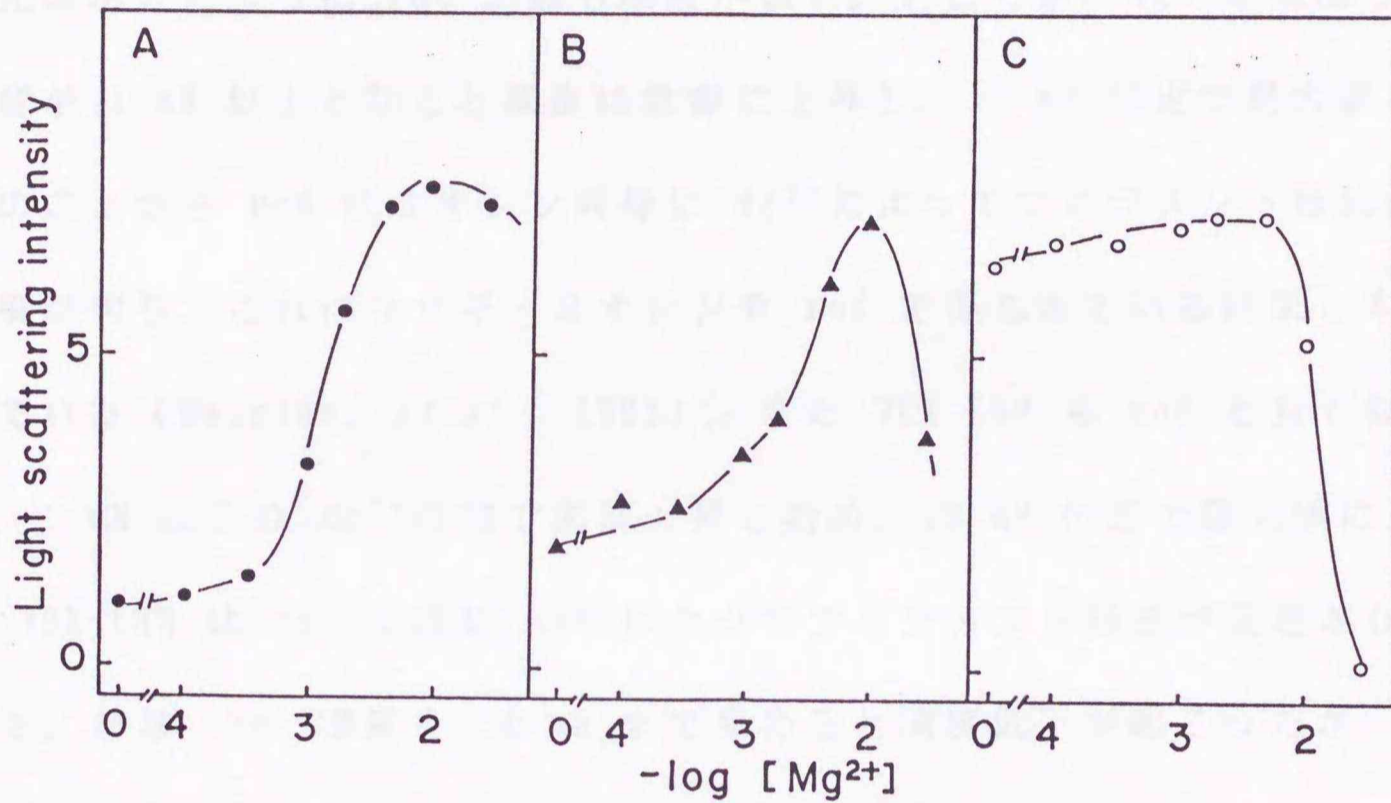


Fig. 39. Effect of  $Mg^{2+}$  on the light scattering intensity of rod, 70k LMM and 40k LMM suspensions.

Rod, 70k LMM and 40k LMM were suspended in a medium of 0.075 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0). The given concentration of  $Mg^{2+}$  was then added to the suspension. The

Mg<sup>2+</sup>はミオシンのフィラメント形成を促進する事が知られている。そこでこれから rod、70k LMM、40k LMM のフィラメント形成における Mg<sup>2+</sup>の効果を調べる事にした。まず瞬間希釈法により 0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)の条件下でフィラメントを形成させた。30 分放置後、フィラメント懸濁液に MgCl<sub>2</sub> を添加していき、その際の濁度変化を測定した (Fig. 39)。Mg<sup>2+</sup>を添加しない場合は先に示したように rod が最も濁度が低い。ところが、Mg<sup>2+</sup>を添加していきその濃度が 1 mM 以上となると濁度は急激に上昇し、10 mM 付近で最大値に達した。このことから rod はミオシン同様に Mg<sup>2+</sup>によってフィラメント形成が促進される事が判り、これはウサギ・ミオシンや rod で得られている結果と本質的に一致していた (Reisler, *et al.*, 1983)。また 70k LMM も rod と良く似た変化を示し、1 mM 以上の Mg<sup>2+</sup>添加で濁度上昇し始め、10 mM 付近で最大値に達した。よって 70k LMM は rod 同様に Mg<sup>2+</sup>によってフィラメント形成が促進されることが判った。なお、Mg<sup>2+</sup>濃度を 30 mM まで高めると濁度低下が起こったが、これは MgCl<sub>2</sub> 添加によりイオン強度が上昇したため、フィラメントの解集合が起こったものと思われる。

一方、40k LMM の場合には Mg<sup>2+</sup>によるフィラメント形成促進は全く見られなかった。すなわち 40k LMM は Mg<sup>2+</sup>非存在下でも高い濁度を示しており、Mg<sup>2+</sup>を加えても濁度上昇は起こらなかった。Mg<sup>2+</sup>濃度が 10 mM 以上では濁度が低下したが、これも 70k LMM 同様にフィラメントが解集合したためと思われた。この解集合による濁度低下は 40k LMM では 10 mM Mg<sup>2+</sup>から起こっているのに、70k LMM では 30 mM で起こり始めている。このことから 40k LMM がイオン強度に対する抵抗性が低いことが支持された。

以上のことより 40k LMM は Mg<sup>2+</sup>がなくてもフィラメントを形成し易く、また

フィラメント形成時に  $Mg^{2+}$  を必要としないことを見いだした。そしてこれが rod の C 末端部分の持つ機能特性であると結論した。この 40k LMM ドメインのフィラメント形成能は優れているのに対し、このドメインより N 末端部分を合わせ持つ rod や LMM のフィラメント形成能は劣るようであった。このことから 70k LMM の N 末端側 20 kDa の部分と S-2 はフィラメント形成を阻害しているとの推測もできた。また、 $Mg^{2+}$  の効果は 40k LMM に対しては見られず、70k LMM 及び rod には同じ様に見られるので、 $Mg^{2+}$  は 70k LMM の N 末端側 20 kDa 部分に作用していると考えられる。そして、 $Mg^{2+}$  は rod や LMM のフィラメント形成を促進させるというよりは、むしろフィラメント形成を阻害する部分に作用して、その阻害を打ち消している、言い替えると機能回復させる役目をはたしていると考えられた。以上のことより、フィラメント形成能を rod 分子内構造と関連づけて説明すると、rod の C 末端 40k LMM 部分はフィラメント形成ドメインであり、そこより S-2 の方へ延びた N 末端側の 20 kDa 部分は  $Mg^{2+}$  で調節される、フィラメント形成調節部位であると推測した。

## 2. ティラピア 39k LMM の単離とそのフィラメント形成能

コイ rod の C 末端の 40k LMM がフィラメント形成ドメインであること、そしてそのドメインは  $Mg^{2+}$  の作用を受けずに優れた自己集合能を有することを明らかにした。第 1 章において、各種魚類 rod をキモトリプシン消化すると、コイの 40k LMM 様の塩溶性分子断片が生成する事を述べた。これら種々の魚類の 40k LMM がコイ 40k LMM と同様の性質を示すかどうかを検討した。

ここでは、先に松浦ら (1985) によってフィラメントを形成しにくい魚種である事が示されているティラピア・ミオシンの 40k LMM 様 LMM を用いた。既に、Fig. 26 に示したようにティラピア rod からのこの成分の生成量は少ないが、このドメインを単離してその性質、特にフィラメント形成能について検討し、さらに、その結果をコイ 40k LMM の場合と比較して、共通点や相違点を明らかにしようとした。

### (1) ティラピア 39k LMM の分離

まず、ティラピア筋原線維から調製した rod (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を更にキモトリプシン消化した (1/250あるいは1/125(w/w)、20°C、30 min)。消化物は 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 6.0)、5 mM  $MgCl_2$  溶液に透析後、超遠心分離して水溶性 S-2 画分と塩溶性 LMM 画分に分画した。その SDS-PAGE 図を Fig. 40 に示す。

ティラピア rod 及び LMM のサイズはコイのものよりも 8~10 kDa ほど大きく、それは C 末端方向に延びていることを Fig. 26 及び Table 4 で述べた。ここで

キモトリプシン量を増やして (1/125 (w/w)) 消化を行ったところ、ティラピア rod はコイ rod と同じサイズまで低分子化した。また、消化物中の LMM も rod 同様低分子化してコイと同じサイズのものへと移っていった。そしてコイ 40k LMM 様の断片と思われた 47k LMM フラグメントも低分子化して 39k LMM となり、サイズの的にはこちらの方が似ていた。この 39k LMM フラグメントは 47k LMM と同様に塩溶性画分中に回収されたので、40k LMM に相当すると推定された。そこでこの最も短い断片を用いて検討する事とした。

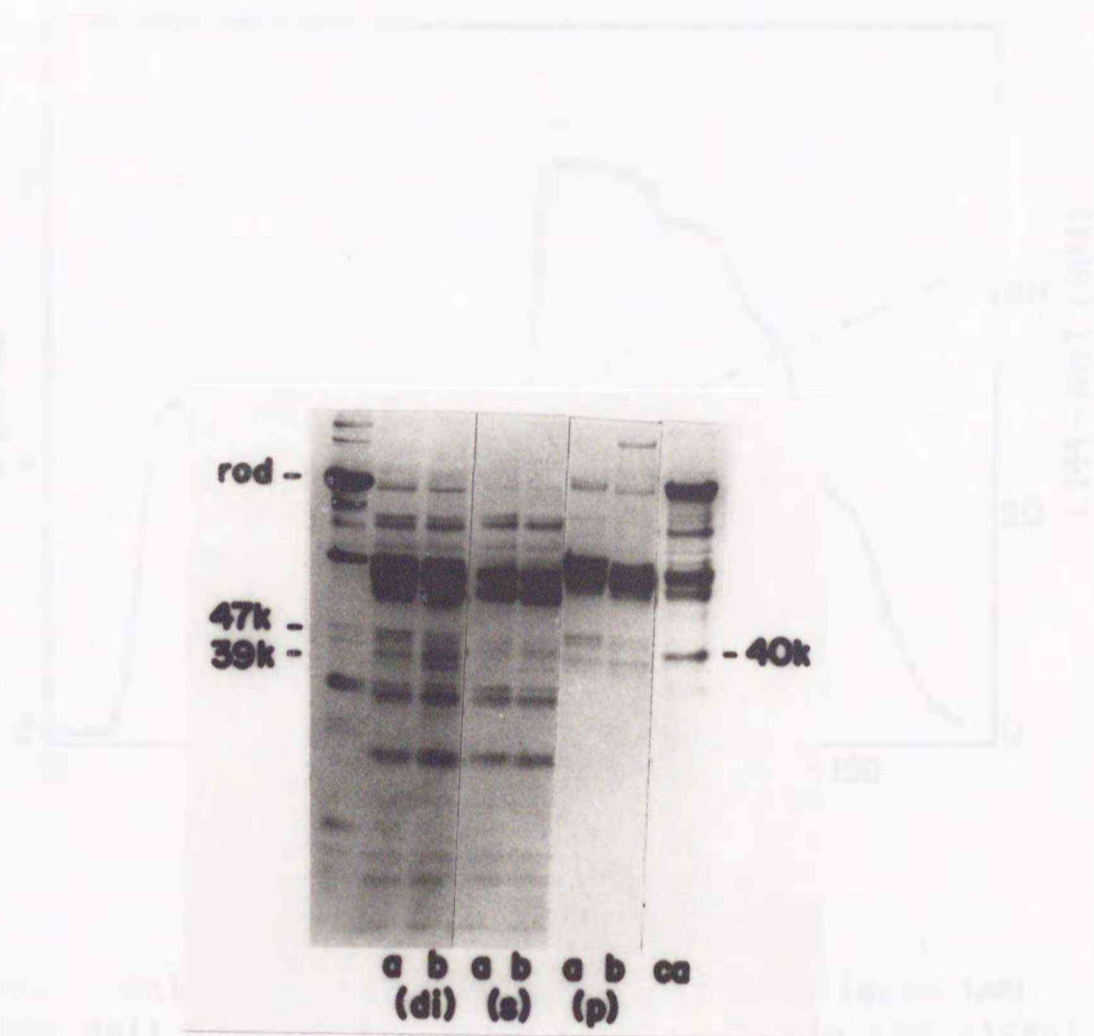


Fig. 40. Chymotryptic digestion of tilapia rod.  
 Tilapia rod in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was digested at 20 °C for 30 min by using 1/250 (a) or 1/125 (b) (w/w) of chymotrypsin. The digest was dialyzed against 0.05 M KCl (pH 6.0) and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, and centrifuged at 80,000xg for 60 min. (di), (s) and (p) indicate the digest, the supernatant and the precipitate after the centrifugation, respectively. Ca is a control chymotryptic digest of carp rod.

ティラピア rod を 47k LMM がほとんど 39k LMM となるまでキモトリプシン消化を続け、消化物の塩溶性画分をコイ LMM と同様に DEAE-Toyopearl に供した (Fig. 41)。Na-PPi の濃度勾配がかかると同時に 39k LMM は小さなピークとして溶出した。消化生成物中の 39k LMM の量が少ないため収量は非常に悪かったが、単離する事ができた。

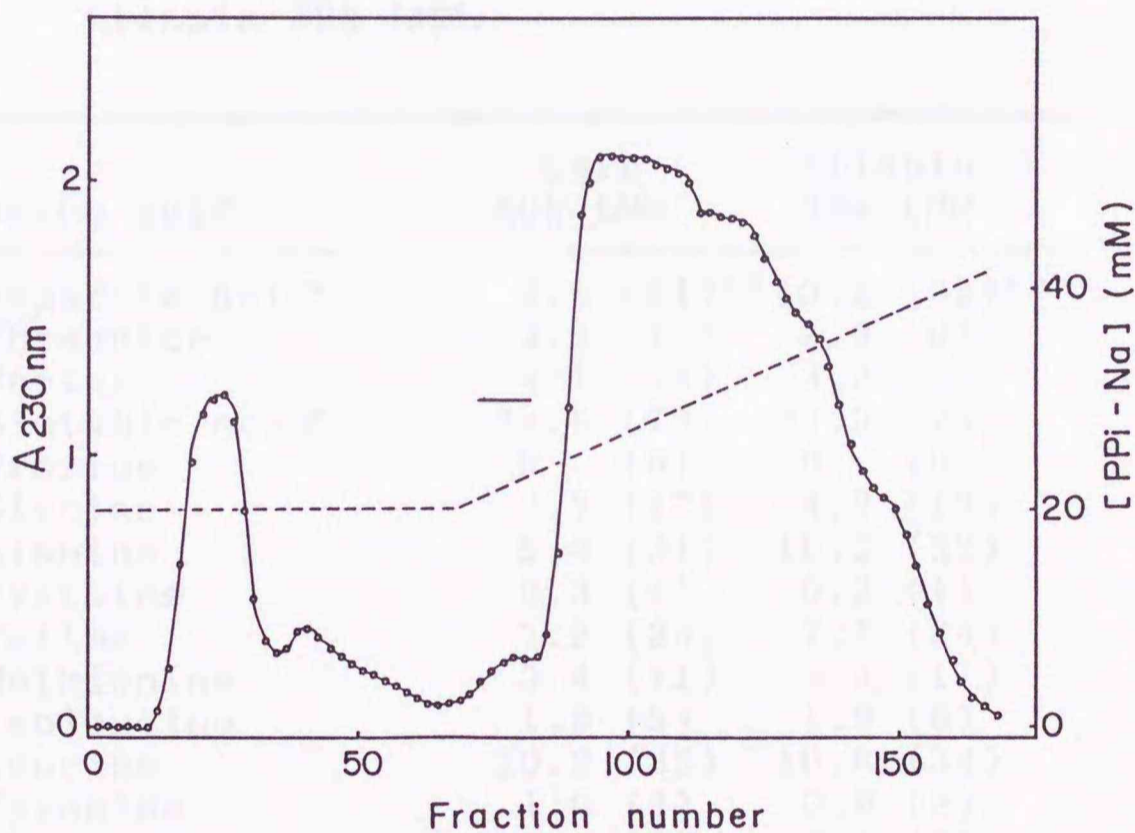


Fig. 41. DEAE-Toyopearl chromatography of tilapia LMM.

The salt-soluble fraction of the tilapia rod digest as in Fig. 40 was dissolved in 20 mM PPi-Na buffer (pH 7.5) and the solution was applied to a DEAE-Toyopearl column (1.4 x 11 cm) equilibrated with the same buffer. The proteins were eluted by a linear gradient of Na-PPi concentration (dotted line). The fractions indicated by bar was pooled and used as 39k LMM.

(2) ティラピア 39k LMM の諸性質

調製したティラピア 39k LMM の諸性質をコイ 40k LMM と比較し、両者の相違点について検討した。

Table 6 にティラピア 39k LMM のアミノ酸組成を示すが、コイ 40k LMM と良く似ていた。特に、Pro、Trp を含まない点でも共通していた。

Table 6. Amino acid compositions of carp 40k LMM and tilapia 39k LMM.

Amino acid	Carp 40k LMM	Tilapia 39k LMM
Aspartic acid* <sup>1</sup>	9.5 (31)* <sup>2</sup>	10.2 (32)* <sup>2</sup>
Threonine	3.4 (11)	2.9 (9)
Serine	4.1 (13)	3.3 (10)
Glutamic acid* <sup>1</sup>	24.8 (79)	23.9 (74)
Proline	0 (0)	0 (0)
Glycine	3.7 (12)	4.2 (13)
Alanine	9.6 (31)	10.2 (32)
Cysteine	0.3 (1)	0.2 (1)
Valine	7.2 (23)	7.5 (24)
Methionine	3.4 (11)	3.4 (11)
Isoleucine	1.6 (5)	1.9 (6)
Leucine	10.2 (33)	10.8 (34)
Tyrosine	1.0 (3)	0.9 (3)
Phenylalanine	0.2 (0)	0.1 (0)
Lyssine	10.3 (33)	10.6 (33)
Histidine	2.0 (6)	1.7 (5)
Tryptophan	0.05 (0)	0.0 (0)
Arginine	7.7 (25)	8.2 (26)
Total	100.0 (320)	100.0 (288)

\*<sup>1</sup> Asparatic and glutamic acids including asparagine and glutamine, respectively.

\*<sup>2</sup> The numbers in parenthesis indicate mols of the residues in a mol of each product.

また、ティラピア 70k LMM、39k LMM の等電点を比較するため、IEF を行った (Fig. 42)。その結果、コイ 40k LMM が 70k LMM よりも高い等電点を持つのと同様に、ティラピア 39k LMM の等電点は 70k LMM よりも高かった。しかもティラピア 39k LMM とコイ 40k LMM の等電点はほぼ一致した。更に DEAE-Toyopearl からのティラピア 39k LMM の溶出は非常に低濃度の Na-Pi で起きる点もコイ 40k LMM と同様であった。これらの事を総合すると、基本的性質においてティラピア 39k LMM はコイ 40k LMM と一致し、負電荷が少ない特徴がある事が確かめられた。

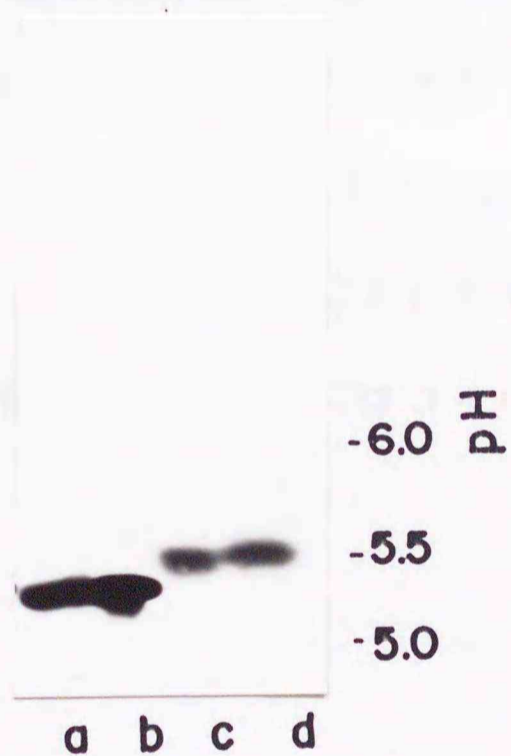


Fig. 42. Isoelectric focusing of tilapia and carp LMM.  
Isoelectric focusing was conducted as in Fig. 30 in the presence of 8 M urea. a, carp 70k LMM; b, tilapia 70k LMM; c, carp 40k LMM; d, tilapia 39k LMM.

### (3) ティラピア 39k LMM のフィラメント形成能

コイ 40k LMM のフィラメント形成能に認められる特徴は、優れたフィラメント形成能を有すること、そして  $Mg^{2+}$  の影響を受けないことであった。このような特徴についてティラピア 39k LMM を用いて検討した。

ティラピア 39k LMM および 70k LMM (0.3 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)) を瞬間希釈法により 0.05 M KCl (pH 7.0 あるいは 6.0) 及び 0.02 M (pH 7.0 あるいは 6.0) 条件にしてフィラメント形成させた。そして 30 分保持後、懸濁液に  $Mg^{2+}$  を添加していったときの濁度変化を測定した (Fig. 43)。

70k LMM (Fig. 43 A) は pH や KCl 濃度によってその絶対値は異なるが、 $Mg^{2+}$  の添加によって濁度上昇が認められた。一方、39k LMM の濁度は (Fig. 43 B) 同条件下で比べると 70k LMM よりも常に高く、またどの条件でも  $Mg^{2+}$  の添加効果は見られなかったため、そのフィラメント形成上の特徴はコイ 40k LMM とよく似ている事が判った。よって、ティラピア においてもフィラメント形成ドメインである 39k LMM の構造や機能特性は基本的にはコイの場合と共通していると結論した。

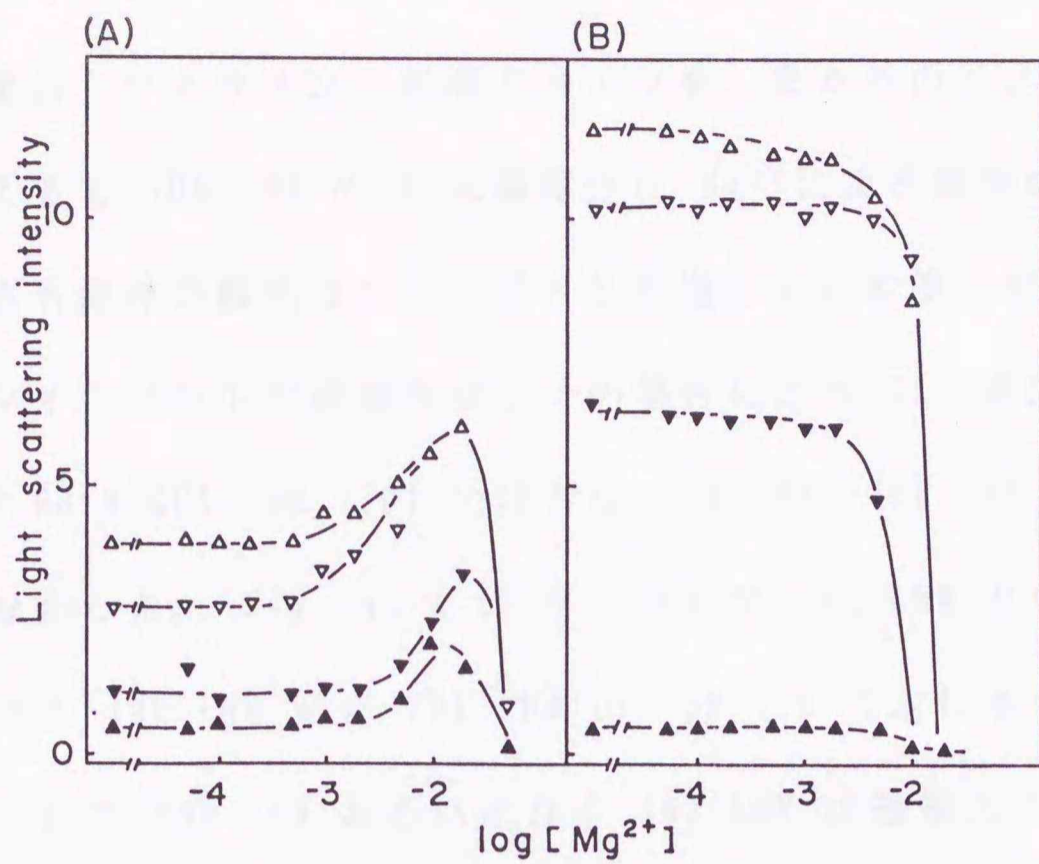


Fig. 43. Effect of  $Mg^{2+}$  on the light scattering intensity of 70k LMM and 39k LMM of tilapia.

Light scattering intensities of 70k LMM (A) and 39k LMM (B) suspensions in the following media were measured in the presence of various  $Mg^{2+}$  concentrations; 0.05 M KCl, pH 7.0, ( $\blacktriangle$ ); 0.05 M KCl, pH 6.0, ( $\triangle$ ); 0.02 M KCl, pH 7.0, ( $\blacktriangledown$ ); 0.02 M KCl, pH 6.0, ( $\triangledown$ ).

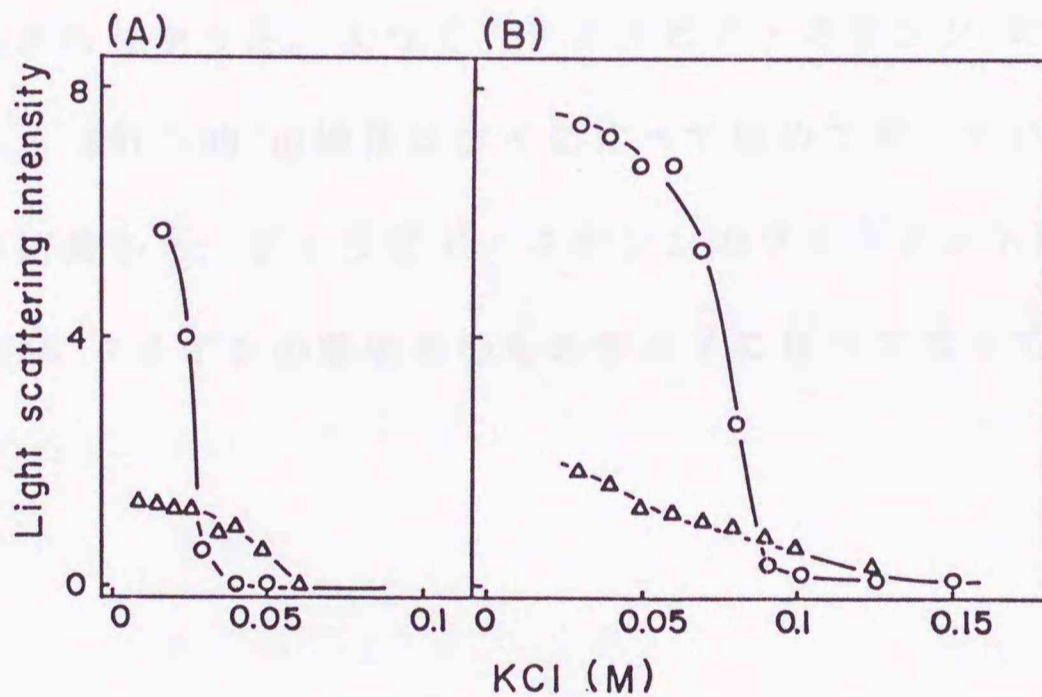


Fig. 44. Comparison of KCl concentration dependence in the light scattering intensity of tilapia LMM and carp LMM.

LMMs from tilapia (A) and carp (B) were suspended in a medium of 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) with various concentrations of KCl. 70k LMM, ( $\triangle$ ); 40k or 39k LMM, ( $\circ$ ).

以上のことより、テイルピア rod 分子内でも、その C 末端部分 (約 40 kDa) に会合能力の優れたフィラメント形成ドメインを、またそのドメインよりも N 末端側、言い替えると 70k LMM の N 末端部分に  $Mg^{2+}$  による調節部位が存在し、rod 内における各部分の機能はコイの場合と共通している事を確かめた。しかし、Fig. 43 でのフィラメント形成条件はコイの場合に比べ KCl 濃度、pH ともに低く、例えば、0.05 M KCl (pH 7.0) の場合は 40k LMM、70k LMM 共に濁度はほとんど検出されなかった。Fig. 44 A にテイルピア 39k LMM 及び 70k LMM の、Fig. 44 B にコイ 40k LMM 及び 70k LMM の、pH 7.0 における KCl 濃度依存性を示す。テイルピア 39k LMM あるいはコイ 40k LMM は通常の LMM より高い濁度を示し、また濁度の低下し始める KCl 濃度が低い事は共通していた。しかし低下の起こり始める KCl 濃度を比較すると、テイルピア LMM の場合はかなり低く、見かけ上の KCl 濃度依存性はコイの場合よりも 0.04~0.05 M 程度も低濃度側にずれているようであった。そしてテイルピア 39k LMM では 0.04 M 以上で濁度はほとんど検出されなかった。よって、テイルピア・ミオシンのフィラメント形成ドメインである 39k LMM の機能はコイに比べて極めて劣っていることが明らかとなった。以上の結果から、テイルピア・ミオシンのフィラメント形成能が劣っているのは 39k LMM ドメインの機能そのものがコイに比べて劣っているためと推測した。

### 3. ウサギ 36k LMM の単離とフィラメント形成能

これまでの結果から魚類ミオシンの場合は rod の C 末端に位置する 40k LMM 部分がフィラメント形成ドメインであることが明らかになり、この部分の性質、機能が共通していると考えられた。ウサギ・ミオシンの rod C 末端部分の性質や機能も共通しているのか検討するために、このドメインを分離しようと試みた。

#### (1) ウサギ 36k LMM の生成条件の検討及びその単離

第1章でウサギ rod をキモトリプシン消化しても 40k LMM の様な短い断片は生成しないことを述べた。またこれまでもこのように短いキモトリプシン断片は報告されていないため、通常の下で消化を行ってもこの部分を分離することはできないと思われた。

さて、尿素はタンパク質間の水素結合を切断し、その立体構造を破壊する作用がある。そこで低濃度の尿素存在下でウサギ rod の立体構造を緩め、その状態でキモトリプシンを作用させて断片化させることを試みた。尿素存在下でのウサギ rod の構造安定性を Fig. 18 で示したが、1.5 M 以下の尿素存在下ではトリプトファン蛍光強度はあまり変化せず、この程度の尿素濃度では大きな立体構造破壊は起こっていないと予想できた。またウサギ rod は 75 % エタノールで変性しても変性剤の除去により構造が回復する事を考えると (Sent-Gyorgi, *et al.*, 1960)、低濃度の尿素で起こる構造変化は尿素を除くと可逆的に戻るのではないかと推測した。

ウサギ rod はコイ同様に DEAE-Toyopearl で精製したものをを用いた。0.5 M

ウサギ rod はコイ同様に DEAE-Toyopearl で精製したものをを用いた。0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液中のウサギ rod に終濃度 0~2.5 M になるように 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) を含む 8 M 尿素溶液を添加し、直ちにキモトリプシン消化を開始した。消化条件はキモトリプシン量 1/100 (w/w)、20°C で 30 分とした。消化物を 0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析し尿素を除いた後、0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に透析し、次いで超遠心分離して、上澄の水溶性画分と沈澱の塩溶性画分に分画した。その SDS-PAGE を Fig. 45 に示す。消化時の尿素濃度が高くなるにつれ消化パターンが複雑になり、低分子化が進む傾向にあった。1~1.5 M 尿素存在下での消化では 40k LMM 付近に生成物がみられ、このうち 43 kDa と 36 kDa のフラグメントが塩溶性の性質を有していた。

これらの成分が生成する最適な消化条件を得るため、1 M 尿素存在下での消化の時間経過を調べた (Fig. 46)。未消化 rod が多量に存在しているような消化初期に塩溶性 43 kDa と 36 kDa フラグメントが生成していたので、これらは比較的選択的な切断を受けて生成するものであると推定した。またウサギ LMM を 1 M 尿素存在下でキモトリプシン消化しても (Fig. 47) この塩溶性 43 kDa と 36 kDa のフラグメントが生成したので、これらは LMM の一部であると判断した。なお、これらのフラグメントの生成に対応する他の生成物を同定することはできず、LMM のどの部分に相当するものかを確認する事はできなかった。しかし、分子サイズが 40 kDa 程度であること、塩溶性の性質を示す事から、コイやティラピアの 40k LMM 様の成分と考えた。塩溶性成分中で最小生成物だった 36 kDa (36k LMM と呼ぶ) 成分について注目する事とした。

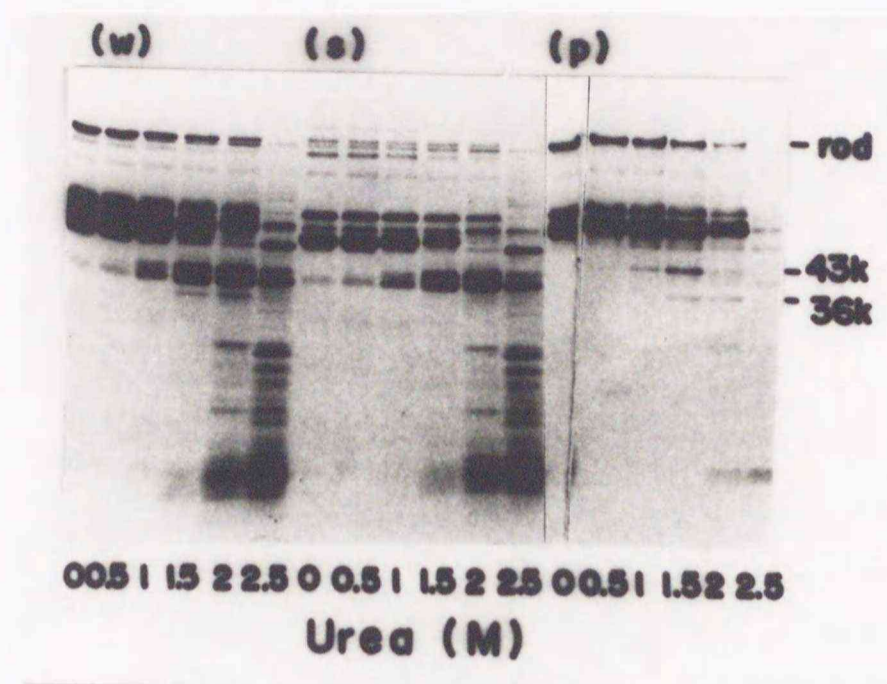


Fig. 45. Effect of urea concentration on the chymotryptic digestion of rabbit rod.

Rabbit rod in 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was digested by using chymotrypsin in 1/100 (w/w) at 20 °C for 30 min in the presence of various concentration of urea. The digest was centrifuged at 80,000 x g for 60 min after dialysis against 0.05 M KCl (pH 7.0). (w), (s) and (p) indicate the whole digest, the supernatant and the precipitate, respectively.

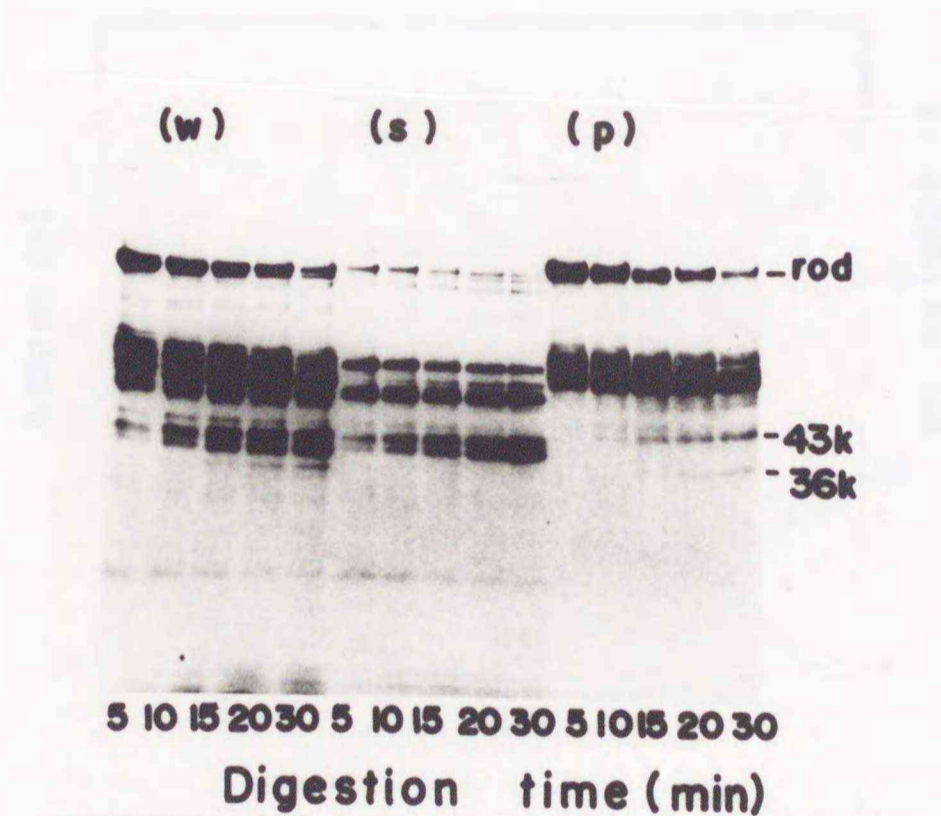


Fig. 46. SDS-PAGE pattern of chymotryptic digests of rabbit rod in the presence of 1 M urea.

Digestion was carried out as described in Fig. 45, except that urea concentration was 1 M. The same procedures as in Fig. 45 were employed to separate the digest (w) into the supernatant (s) and the precipitate (p).

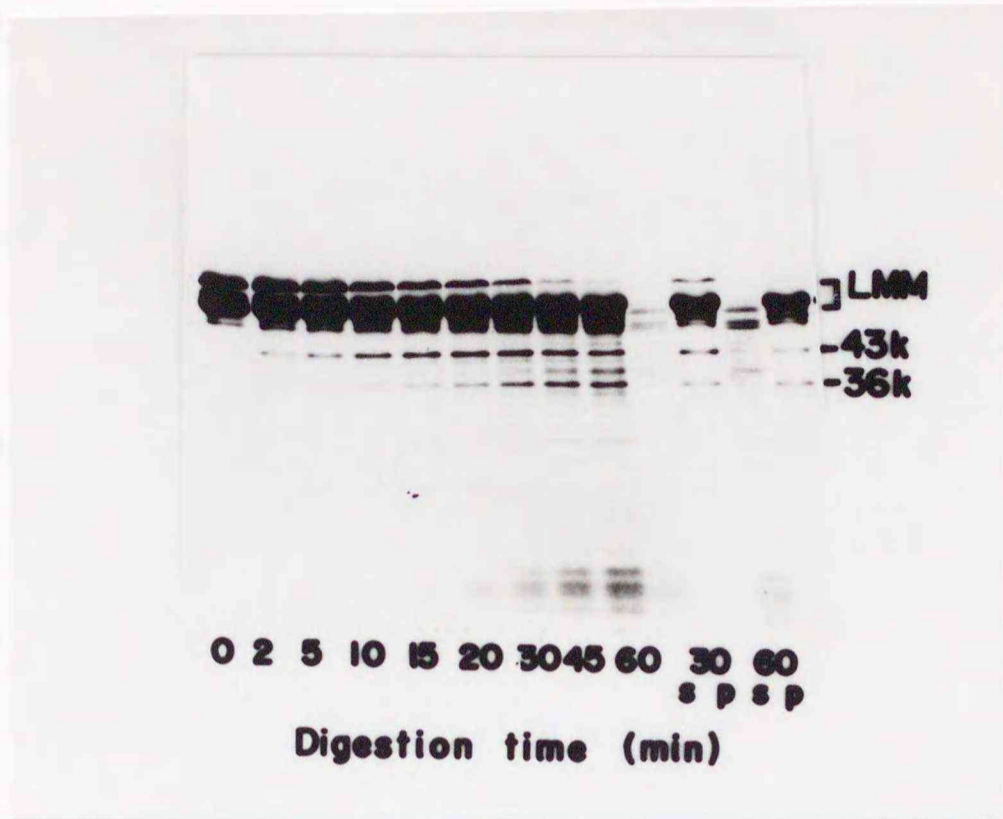


Fig. 47. SDS-PAGE pattern of chymotryptic digests of rabbit LMM in the presence of 1 M urea.

Rabbit LMM was digested by chymotrypsin using 1/250 (w/w), at 25 °C as described in Fig. 46. (s) and (p) indicate the supernatant and the precipitate, respectively as separated in Fig. 45.

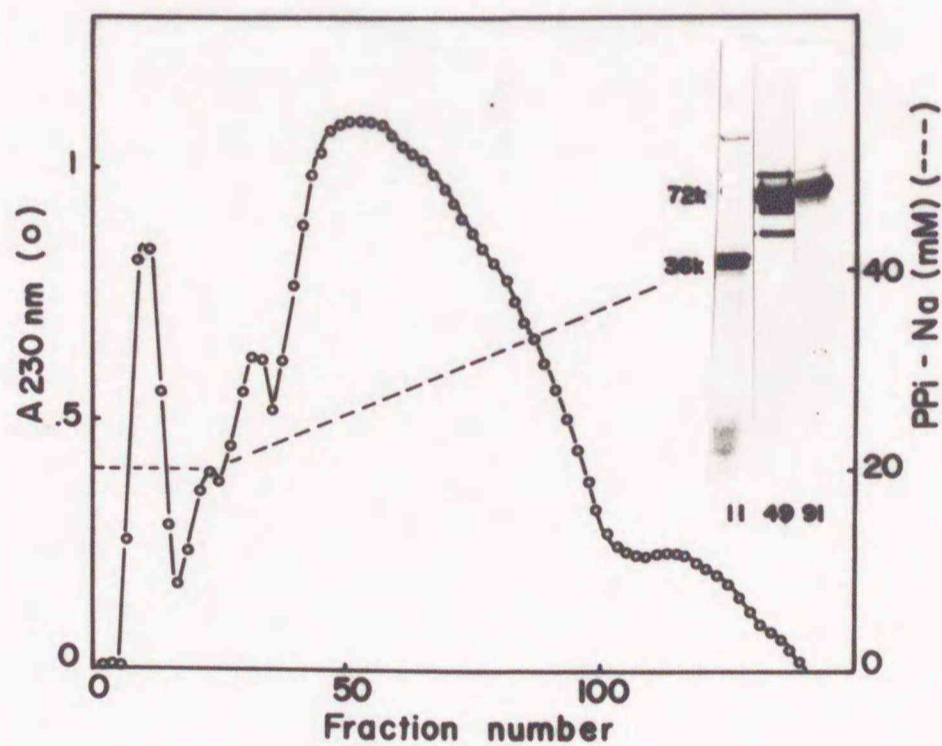


Fig. 48. Separation of rabbit 36k LMM on DEAE-Toyopearl.

Rabbit rod was digested in the same medium as described in Fig. 46, and the water-insoluble fraction obtained was dissolved in 20 mM Na-PPi (pH 7.5). The conditions for chromatography were as in Fig. 28. The insert represents SDS-PAGE patterns of the fractions. Fraction numbers are shown below the gels. The arrow indicates the fraction of the rabbit 36k LMM.

ウサギ 36k LMM を魚類のそれと同じ方法で単離しようと試みた。rod 消化物の塩溶性画分を 20 mM Na-PPI (pH 7.5) 溶液に透析し、コイ 40k LMM 精製時と同条件の DEAE-Toyopearl に供した (Fig. 48)。その結果、36k LMM フラグメントは矢印に示した非吸着区分に溶出された。なお、カラムに供したサンプル量が多かったため、LMM のピークはブロードで大きなものとなったが、36k LMM は 72k LMM から完全に分離され、単離精製できた。

このウサギ 36k LMM も DEAE-Toyopearl に非常に吸着しにくく、ほぼ非吸着区分に溶出される事から、その分子表面には負電荷が少ないことが推定された。次にウサギ 36k LMM は 72k LMM のどの部分に相当するのかを調べた。ウサギ LMM 部分のアミノ酸配列が cDNA 解析から予想されており、それによるとウサギ rod に含まれる 2 個の Trp は HMM/LMM junction 付近と LMM の N 末端部分に存在している (Maeda, et al, 1987)。アミノ酸分析の結果 (Table 7) によると 36k LMM は Trp を含んでおらず、LMM の N 末端部分を含んでいないことを確かめた。電荷特性も考え合わせると、36k LMM は 72k LMM の C 末端側を含む断片ではないかと思われた。

Table 7. Amino acid compositions of rod, 72k LMM and 36k LMM from rabbit

Amino acid	rod	72k LMM	36k LMM
Aspartic acid* <sup>1</sup>	8.8 (93)* <sup>2</sup>	9.7 (56)* <sup>2</sup>	11.6 (33)* <sup>2</sup>
Threonine	3.9 (42)	4.0 (23)	4.3 (12)
Serine	4.7 (50)	3.9 (22)	4.2 (12)
Glutamic acid* <sup>1</sup>	26.8 (282)	26.2 (151)	21.4 (62)
Proline	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Glycine	2.5 (26)	2.2 (13)	4.0 (12)
Alanine	9.4 (99)	9.2 (53)	8.4 (24)
Cystein	0.6 (6)	0.5 (3)	0.1 (0)
Valine	3.6 (38)	4.5 (26)	5.5 (16)
Methionine	2.2 (23)	2.0 (12)	2.7 (8)
Isoleucine	3.8 (40)	4.5 (26)	4.9 (14)
Leucine	12.4 (115)	11.3 (65)	10.9 (31)
Tyrosine	0.7 (7)	1.0 (6)	1.1 (3)
Phenylalanine	0.9 (9)	0.5 (3)	0.5 (1)
Lyssine	11.6 (123)	11.0 (63)	9.8 (28)
Histidine	1.9 (20)	2.3 (13)	2.4 (7)
Tryptophan	0.2 (2)	0.2 (1)	0.0 (0)
Arginine	6.0 (64)	7.0 (41)	8.1 (23)
Total	100.0(1040)	100.0(576)	100.0(288)

\*<sup>1</sup> Asparatic and glutamic acids including asparagine and glutamine, respectively.

\*<sup>2</sup> The numbers in parenthesis indicate mols of the residues in a mol of each product.

## (2) ウサギ 36k LMM のフィラメント形成能

次にウサギ 36k LMM のフィラメント形成能について検討した。尿素処理によるフィラメント形成能への影響が考えられるため、対照とした 72k LMM は尿素中の rod 消化物から、36k LMM と同時に分離したものを、また rod は 1 M 尿素中で 25 °C 20 分間保持した後に尿素を除く処理を行ったものを用いた。

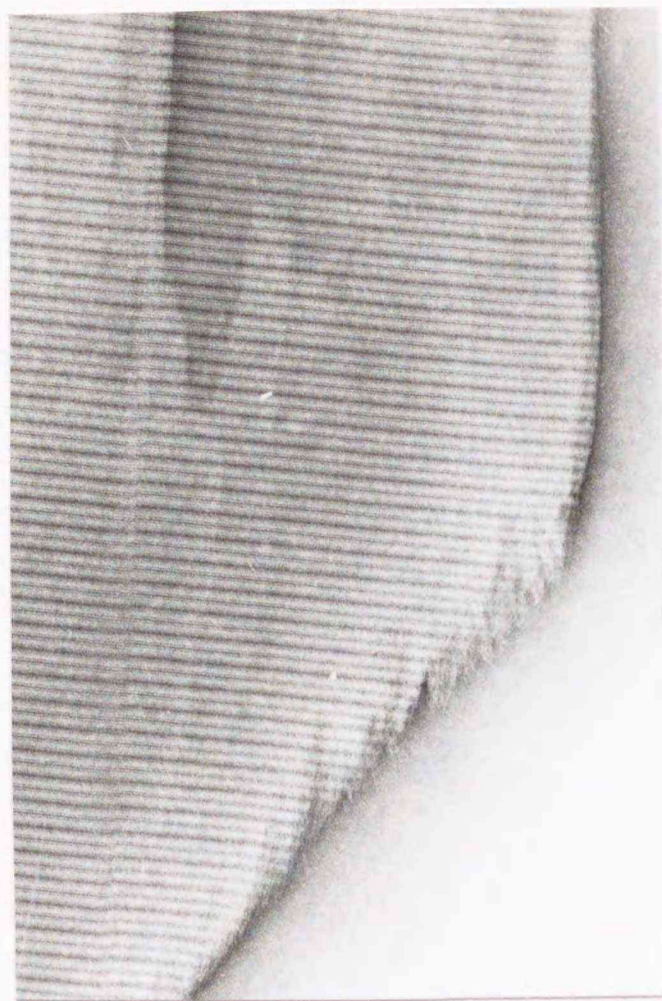
先ず、36k LMM (0.3 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)) を段階希釈法により 0.1 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) まで KCl 濃度を低下させ、形成した集合体の形態を電子顕微鏡観察した。その電子顕微鏡写真を Fig. 49 に示す。36k LMM は非常に幅の広いシート状のパラクリスタルを形成しており、コイ 40k LMM のように side-by-side に分子が集合し易いことが観察された。そして、その表面構造が明瞭に観察でき、いずれも周期性を示していた。(a)、(b) に示すパラクリスタルは約 36 nm の大きな周期の中央に、更に細い 3 本の縞が観察されるという非常に細かい周期性を示した。また (c) の様に約 18 nm の一律な周期性を示すものや、それらの中間のような周期性を持つものなどもあった。いずれにしても細かいはっきりとした周期性を示す事、また横に広いシートタイプのパラクリスタルである事など、その形態はコイ 40k LMM の場合と似ていた。ただし、その周期幅は若干異なっていた。なお、Fig. 50 に、同条件下でのウサギ rod フィラメント (A) 及び 72k LMM パラクリスタル (B) の電子顕微鏡写真を示すが、すでに報告されているものと変わらず (Huxley, 1963; Chowrashi & Pepe, 1977; Katsura & Noda, 1973; Bennett, 1981; Lowey, *et al.*, 1967; Yagi & Offer, 1981)、尿素処理の影響はないことが判った。また、形態や周期幅は 36k LMM とは明らかに異なり、それぞれコイ rod や 70k LMM の場合と似ており、rod の

各部分の形成するフィラメント（パラクリスタル）の形態はコイでもウサギでも似ていると結論した。

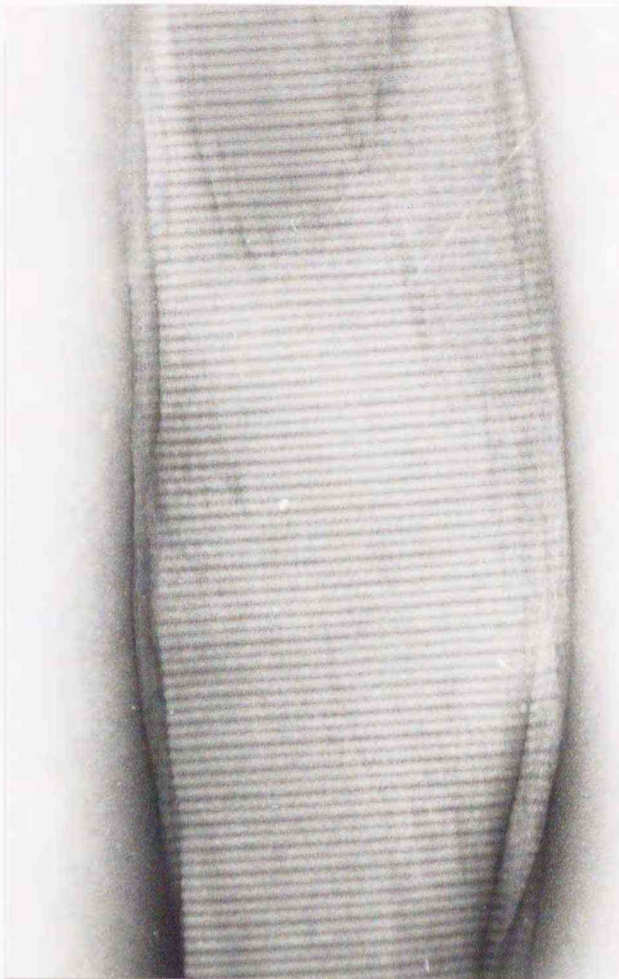
次にウサギ 36k LMM のフィラメント形成に及ぼす  $Mg^{2+}$  の影響を調べた。対照として rod、72k LMM の場合も調べた。0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 条件下で瞬間希釈によりフィラメントを形成させ、その懸濁液に  $Mg^{2+}$  を加えていったときの光散乱強度変化を測定した (Fig. 51)。ウサギ rod 及び 72k LMM は コイのそれらと比較するとフィラメント形成し易く、 $Mg^{2+}$  非存在下での濁度が高かった。しかし、 $Mg^{2+}$  の添加によりさらに濁度上昇が起こり、 $Mg^{2+}$  のフィラメント形成促進効果が認められた。一方、36k LMM は  $Mg^{2+}$  を添加してもそれ以上の濁度上昇は認められず、 $Mg^{2+}$  濃度の上昇により解集合するのみであった。

以上より、ウサギ 36k LMM は、分子表面の負電荷が少ないこと、幅の広いシート状のパラクリスタルを形成すること、及びフィラメント形成時に  $Mg^{2+}$  の影響を受けないという機能特性を持つことが判った。この様な構造および機能の特性はコイ 40k LMM と酷似している事から、この部分の性質や機能はウサギ・ミオシンにおいても共通していると結論した。

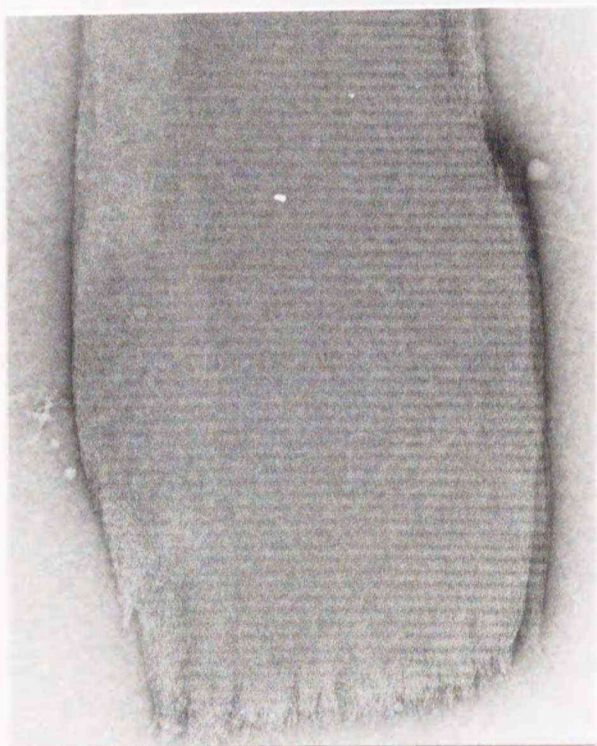
a



b



c



d

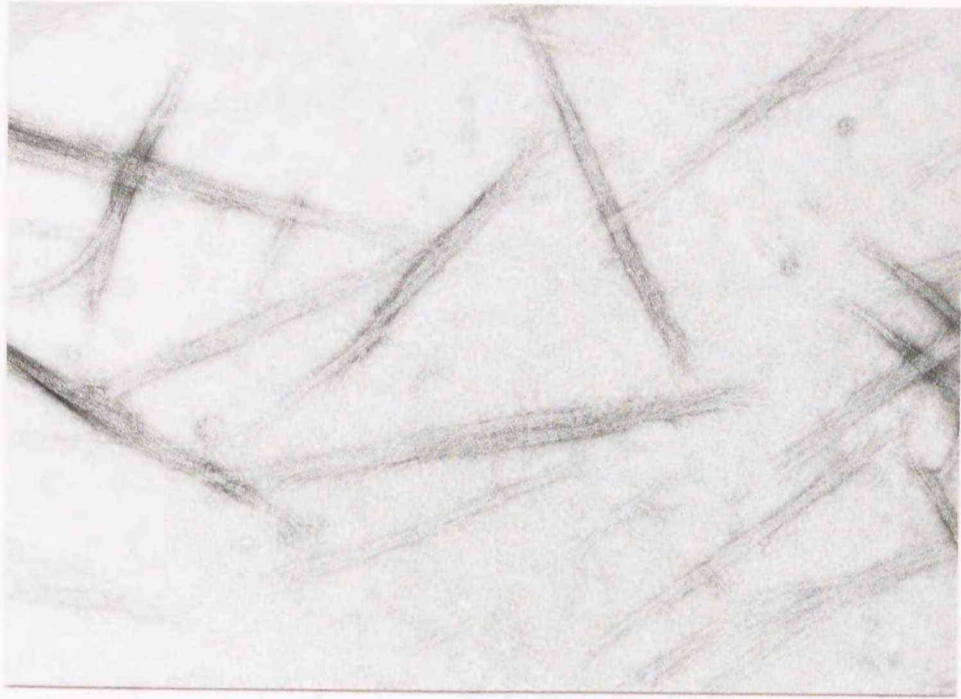


—  
0.1 $\mu$ m

Fig. 49. Electron micrographs of the rabbit 36k LMM paracrystal.

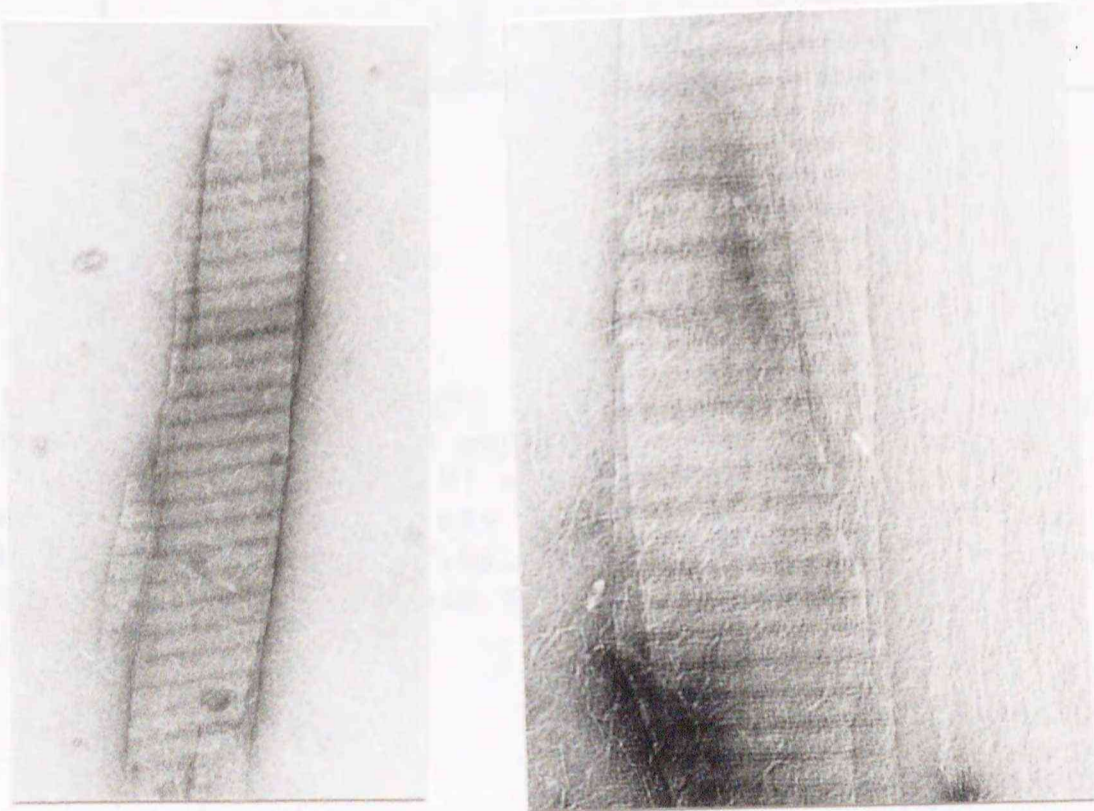
The condition for paracrystal formation of rabbit 36k LMM was the same as in Fig. 32; 0.1 M KCl, pH 7.0. a-d show different shapes of paracrystals.

(A)



—  
0.1 $\mu$ m

(B)



—  
0.1 $\mu$ m

Fig. 50. Electron micrographs of the rabbit rod filament and rabbit 72k LMM paracrystal.

Rabbit rod filament (A) and 72k LMM paracrystal (B) were formed under the same conditions as in Fig. 49.

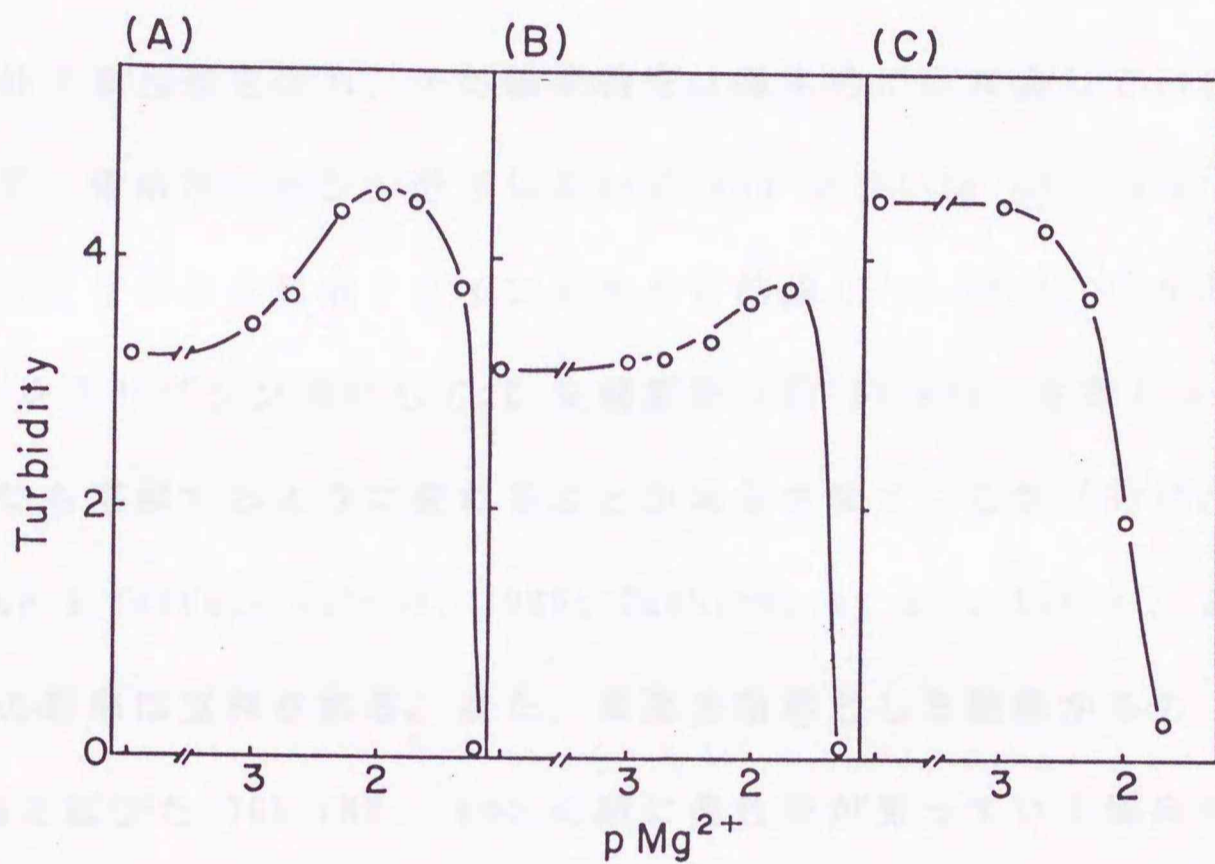


Fig. 51. Effect of  $Mg^{2+}$  on the light scattering intensity of rabbit rod, 72k LMM and 36k LMM suspensions.

Rod(A), 72k LMM (B) and 36k LMM (C) from rabbit myosin were suspended separately in a medium of 0.075 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0). The scattering intensities were measured in the presence of various concentrations of  $Mg^{2+}$ .

#### 4. 小考察

第1章において単離精製する事に成功したコイ 40k LMM の分子集合能について、検討したところ、非常に自己集合し易く、シート状の幅広いパラクリスタルを形成すること、そして集合時に  $Mg^{2+}$  の影響を受けない事が確かめられた。コイ以外の魚類 rod からも、またウサギ rod からもこのドメインを調製したが、それらはいずれも分子集合能を持ち、その機能特性は基本的には共通している事を確かめた。よって、骨格筋ミオシン分子において rod あるいは LMM の C 末端 40 kDa 部分がフィラメント形成ドメインであると結論した。なお、ウサギ及びニワトリの LMM をトリプシン消化して C 末端部分 (約 10 kDa) を取り去ると低イオン強度溶液にも溶解するようになると報告されているが (Nyitray, *et al.*, 1983; Crosse & Vardekerckhove, 1986; Tashiro, *et al.*, 1985)、このことから本研究の結果は支持される。また、濁度を指標とした結果からも 40k LMM より N 端方向に延びた 70k LMM、rod の順に集合能が劣っていく傾向がみられた。これらを考え合わせると、フィラメント形成ドメイン以外の部分はむしろフィラメント形成を阻害しているといえた。

$Mg^{2+}$  が存在すると HMM/LMM junction がプロテアーゼ消化され難くなることから、この付近にアフィニティーの低い  $Mg^{2+}$  結合部位があると推測する研究例がいくつもあるが (Reisler, *et al.*, 1983; Borejdo & Werber, 1982; Ueno, *et al.*, 1983; Chourashi & Pepe, 1986; Persechini & Rowe, 1984)、本論文においてはこの junction よりもやや LMM 側の 20 kDa 部分が  $Mg^{2+}$  作用部位であると結論した。そして  $Mg^{2+}$  はこの部分のフィラメント形成阻害を打ち消す役目をはたしていると推測した。言い替えると 40k LMM がフィラメント形成ドメインであるのに

対し、この 20 kDa 部分は  $Mg^{2+}$  による調節部位という事になる。

これまでの報告によると S-2 部分はフィラメント形成には直接関与せず、ミオシン及び rod のフィラメント表面から浮いていると考えられているが (Ueno & Harrington, 1986, a, b; Chiano & Harrington, 1979; Sutoh, *et al.*, 1987; Reialer & Liu, 1982)、本研究においても rod フィラメント表面には周期性が観察され難かったことからこのことは支持される。また、40k LMM 分子は side-by-side に会合し易く、パラクリスタルは縦方向よりも横方向に伸長する傾向にあったのに対して、70k LMM から rod へと、N 端方向の S-2 部分が長くなるにつれて、集合体の幅が狭くなっていき、特に rod の場合はシート状のものは形成せず、ミオシンフィラメントと良く似た細長い形態をとっていた。このことから、rod では S-2 部分がフィラメント表面から浮いているため、side-by-side の分子結合が物理的に阻害されている事、換言すると S-2 は横方向への分子集合を阻止しているように思われた。

生体内におけるミオシンの機能を考えると、会合し易い事が必ずしも機能的とは結びつかない。生体内ではミオシンは太いフィラメントを形成しているが、これがシート上の幅広い集合体ではミオシン頭部がアクチンフィラメントと相互作用できず、筋収縮できなくなる恐れがある。事実、パラミオシンというミオシンフィラメントの芯になるタンパクの集合能が異常に発達した線虫の突然変異体では、ミオシンの太いフィラメントが形成されず運動能力を失ってしまう事が報告されている (安藤、香川, 1991)。筋収縮を円滑に行うためには、ミオシンが自己集合すると共に、適度な太さ、長さ、構造のフィラメントを形成する事が必要と思われる。その意味では S-2 も非常に重要な役割を担っていると考えられる。

さて、フィラメント形成における  $Mg^{2+}$  の作用機構について、 $Mg^{2+}$  の影響を受

けない 40k LMM の性質と関連させて考察した。ミオシンや rod などのフィラメント形成にはイオン強度や pH が影響することから、分子間の電荷的相互作用が重要な役割を占めているものと予想される (McLachlan & Karn, 1982; Atkinson & Stewart, 1991)。パラミオシンの集合体形成には電荷のバランスが重要であるとの報告もある (Gengyo-Ando & Kagawa, 1991)。40k LMM の特徴的性質の1つは分子表面の負電荷量が少ないことであり、逆に LMM の N 端の 20 kDa 部分には負電荷が局在している事を述べた。これが  $Mg^{2+}$  の作用を受けるか否かの違いを生みだし、20 kDa 部分の負電荷に  $Mg^{2+}$  が結合すると予想された。 $Mg^{2+}$  は高濃度で効果を発揮する事を考えると、特殊な結合部位が存在するというよりも、分子表面の負電荷に作用していると考えられる。すなわち、 $Mg^{2+}$  は rod や LMM 内の負電荷に富む 20 kDa 部分に作用すること、そしてその負電荷を打ち消し電荷のバランスを整え、フィラメント形成能を回復させると推測した。

## 第2節 化学修飾法による rod の分子内機能解析

前節において rod のフィラメント形成ドメインである 40k LMM の機能を詳細に検討したところ、この部分のフィラメント形成能は非常に優れている事、更にフィラメント形成時に  $Mg^{2+}$  の影響を受けないという特徴がある事を明らかにした。また、40k LMM 部分はその分子表面に負電荷量が少ないという特徴も有していた。そして  $Mg^{2+}$  は rod や LMM の負電荷に作用していると推測した。

この節では分子表面の電荷とフィラメント形成能の関係を明らかにしようとした。上記の推測が正しいならば、フィラメント形成時に  $Mg^{2+}$  要求性を示す rod でも、負電荷量を少なくすると 40k LMM 様の機能特性を示すはずである。そこで rod 分子のアスパラギン酸及びグルタミン酸といった酸性アミノ酸残基側鎖のカルボキシル基を化学修飾して総負電荷量を変える事を試みた。表面電荷を変えた rod のフィラメント形成能の変化から分子の表面電荷とフィラメント形成能の関係、特にフィラメント形成に影響を与える因子 (pH、 $Mg^{2+}$ ) の役割について考察しようとした。

### 1. EDC を用いた rod のカルボキシル基、アミノ基修飾によるフィラメント形成能の変化

水溶性カルボジイミドである EDC はカルボキシル基を活性化し、アミノ基との間に酸アミド結合を作らせる化学架橋剤である。この架橋反応はカルボキシル基とアミノ基が近接していないと起こらないことから、例えばアクチンと S-1 の

EDC 架橋部位からその結合部位が同定されている (Sutoh, 1983)。この場合はタンパク質の Asp、Glu 残基の側鎖であるカルボキシル基とタンパク質の Lys 残基の側鎖であるアミノ基を架橋させている。しかし、EDC などのカルボジイミド剤はカルボキシル基の化学修飾剤として開発された試薬であり、アミノ基供与体として遊離のアミンを用いて、タンパク質のカルボキシル基に結合させることもできる (Mejillano & Himes, 1991; Preston & Seiber, 1991)。そこで EDC 架橋法を用い、rod 分子の酸性アミノ酸残基のカルボキシル基をアミド化することを試みた。

アミノ基供与体としては rod 表面に架橋結合させても物理的に障害になりにくく、反応基や電荷を持たないものが適していると考え、グリシンエチルエステル (GEE) を用いる事とした。この化合物はグリシンのカルボキシル基がエチル基でブロックされているので、EDC はグリシンのアミノ基のみに作用する。EDC によって rod 上のカルボキシル基に GEE を結合させ、rod 分子の負電荷量を低下させる事を試みた。

#### (1) カルボキシル基修飾によるコイ rod のフィラメント形成能の変化

0.4 M GEE (pH 7.0) を含む 0.5 M KCl、20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) 溶液中の rod (1 mg/ml) に終濃度で 0~10 mM となるように EDC を添加し、20 °C で2時間架橋反応を行った。対照として GEE 非存在下でも反応を行った。反応は 10 mM 2-メルカプトエタノールを添加して停止した。EDC 架橋反応を行った rod の SDS-PAGE 図及び Urea-PAGE 図を Fig. 52 に示す。

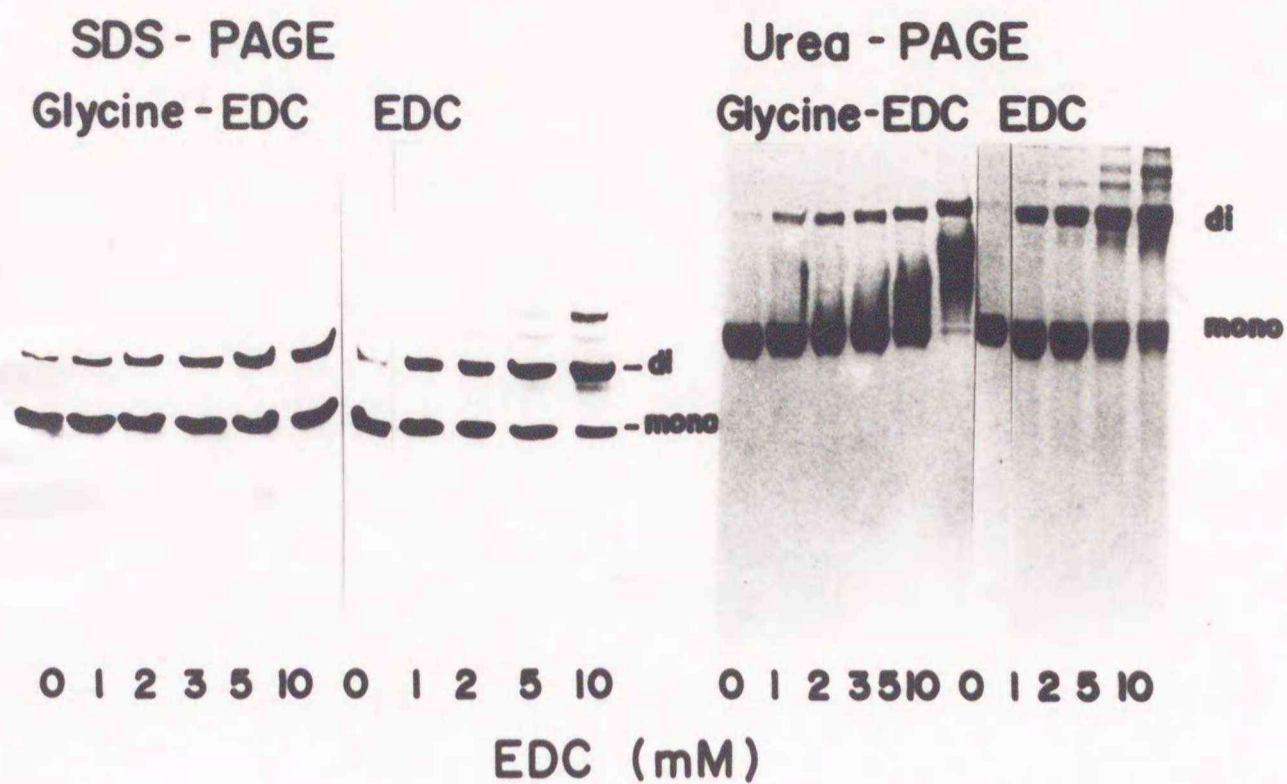


Fig. 52. SDS-PAGE and urea-PAGE of EDC modified carp rod with or without GEE.

Carp rod in 0.5 M KCl and 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) was incubated with various concentrations of EDC with or without 0.4 M GEE at 20 °C for 2 hr. The proteins were analyzed either by SDS-PAGE on 2.7 % acrylamide gel containing 0.5 % agarose or by urea-PAGE on 4 % acrylamide gel containing 8 M urea. (Glycine-EDC), rod treated with 0.4 M GEE and EDC; (EDC), rod treated with EDC alone. di and mono indicate dimer and monomer of rod subunit, respectively.

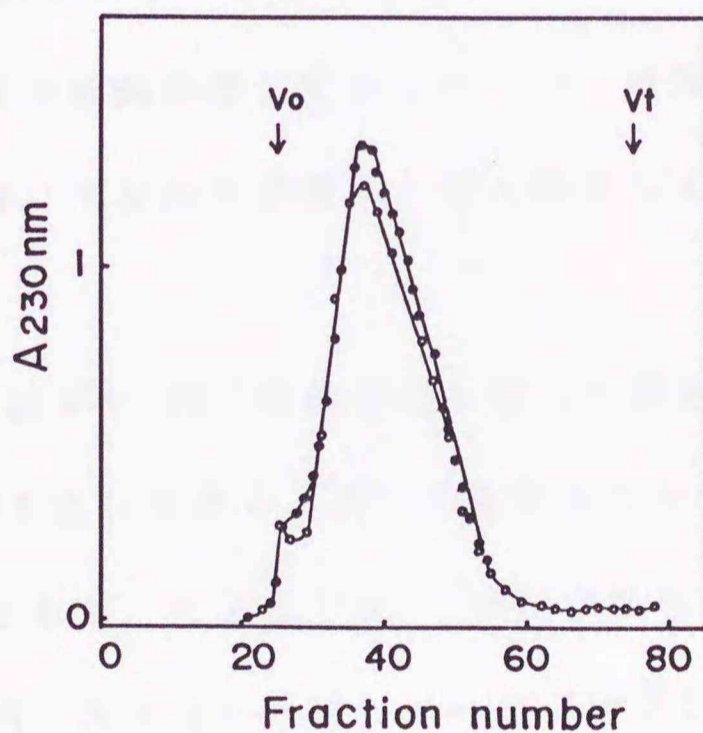


Fig. 53. Sepharose CL-4B chromatography of carp rod modified with EDC in the presence of GEE.

Unmodified (○) and modified rods at 10 mM EDC with 0.4 M GEE as in Fig. 52 (●) were applied to Sepharose CL-4B gel column (1.2 x 32 cm) equilibrated with 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5).  $V_0$  and  $V_t$  indicate the void volume and bed volume, respectively.

GEE 存在下で修飾を行った場合、反応時の EDC 濃度が高くなるに従い SDS-PAGE 上の rod (130 kDa) のバンドが減少し、かわって 2 量体に相当するバンドの生成量が増加した。例えば、EDC 濃度 10 mM で修飾を行った場合には約 50 % が 2 量体に移行していた。しかし、2 量体以上の架橋生成物は認められなかった。この EDC 修飾 rod を Sepharose CL-4B ゲル濾過に供しても (Fig. 53)、溶出位置は非修飾の rod と変わらなかった。従って、SDS-PAGE 上で見える 2 量体のバンドは rod 分子を構成している 2 本のサブユニット間で EDC 架橋が起きた分子内架橋産物であると判断した。また同標品の Urea-PAGE 図を見ると EDC 濃度が高くなるに従い、rod 単量体のバンドが減少し、2 量体の量が増したが、新しいバンドとして単量体と 2 量体の間に泳動されるブロードな成分が増加していった。特に 10 mM EDC で修飾を行った場合、SDS-PAGE 上では単量体 rod は半分程度残っているのに対し、尿素電気泳動上は非修飾 rod と同じ位置にはバンドはほとんど見られず、よりゲルの上方に移っていた。また 2 量体のバンドの移動度も EDC 量の増加と共にわずかに小さくなっていった。Urea-PAGE ではタンパク質自身の持つ負電荷量で泳動距離が変わるが、EDC 修飾反応を行った rod 標品には泳動されにくい成分、すなわち負電荷が順次減少している修飾 rod が増えている事を示している。

一方、GEE 非存在下で EDC 架橋反応を行った場合、SDS-PAGE では 2 量体への移行が GEE 存在下より大きく、更に 2 量体よりも架橋の進行した多量体と思われる生成物が検出された。このことは、GEE が存在しないとアミノ基供与体が rod のアミノ酸側鎖のみとなるため、rod 分子内だけでなく rod 分子間でも架橋が起こったことを示す。また、Urea-PAGE 上でも重合体のバンドは確認できたが、単量体や重合体など全てのバンドの移動度は全く変わらず、電荷変化は起こって

いなかった。

これらの結果から、高濃度の GEE 存在下で rod を EDC 処理すると分子内架橋までは起こるものの、それ以上の架橋は起こらず、GEE を rod のカルボキシル基に架橋でき、負電荷量を小さくできる事が示された。このカルボキシル基の修飾反応は反応溶液中の GEE の濃度と rod の濃度に依存しており、rod 分子間の架橋を起こらなくするためには反応溶液中の GEE 濃度を高く (0.4 M)、かつ rod の濃度を低く (1 mg/ml) する必要があった。また、加える EDC 量によって修飾反応の度合いを調節したが、同一条件でも必ずしも同じ修飾度合いとはならず、Fig. 54 に示すように、2 mM EDC によって Urea-PAGE 上での単量体 rod の移動度が全て均一的に小さくなるまで修飾が進む場合もあった。その原因は明かではないが、微妙な条件の変化で影響がでるようで、同程度の修飾を受けた標品を再現性良く調製する事は難しかった。

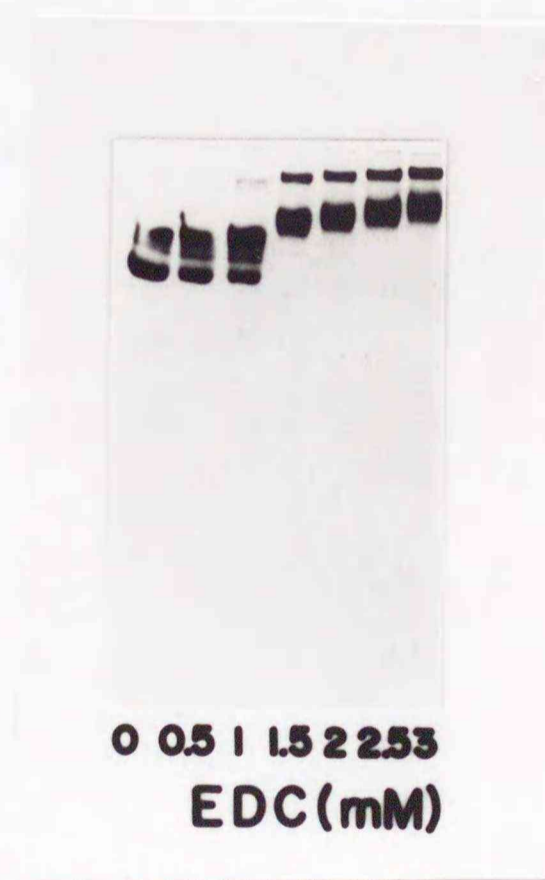
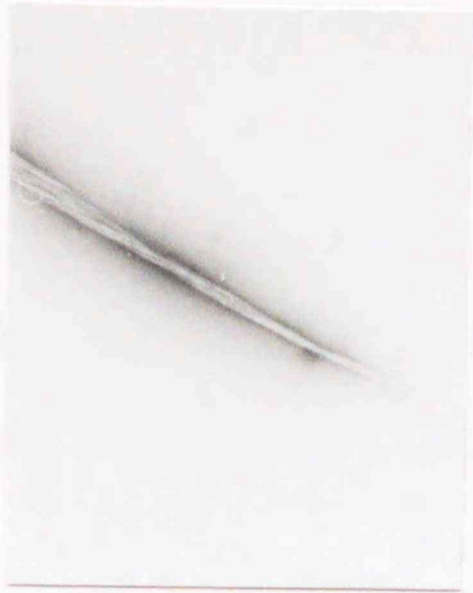


Fig. 54. Urea-PAGE pattern of carboxyl modified carp rod with EDC.

Carboxyl group of carp rod was modified with various concentrations of EDC in the presence of 0.4 M GEE. Urea-PAGE was carried out as described in Fig. 52.

このようにしてカルボキシル基を EDC 修飾した rod について、そのフィラメント形成能を検討した。修飾 rod は 0.3 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 溶液に透析し、未反応の GEE や EDC などを除いてから使用した。これら rod を 0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) または 0.075 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に段階的に希釈し、その際形成したフィラメントを電子顕微鏡観察した。Fig. 55 に非修飾及び修飾 rod のフィラメントの電子顕微鏡写真を示す。まず pH 7.0 で形成させたフィラメントについて比較すると、修飾 rod は非修飾 rod とよく似た細長いフィラメントを形成していた。よく見るとやや細くてフレキシブルな構造をしている様にも見受けられた。これはそれほど大きな違いとはいえないが、rod 表面に GEE が結合した事による影響とも思われた。一方、7.5 でフィラメント形成させた場合は、非修飾 rod は pH 7.0 に比べ形成するフィラメントは非常に細く短いミニフィラメント様のものであり、一般にアルカリ側ではフィラメントが形成しにくいという結果と一致する。ところが、修飾 rod は pH 7.5 でも pH 7.0 と同様のフィラメントを形成した。このことから、EDC 修飾により負電荷量を低下させた事で、アルカリ側でのフィラメント形成能が改善された事が示唆された。

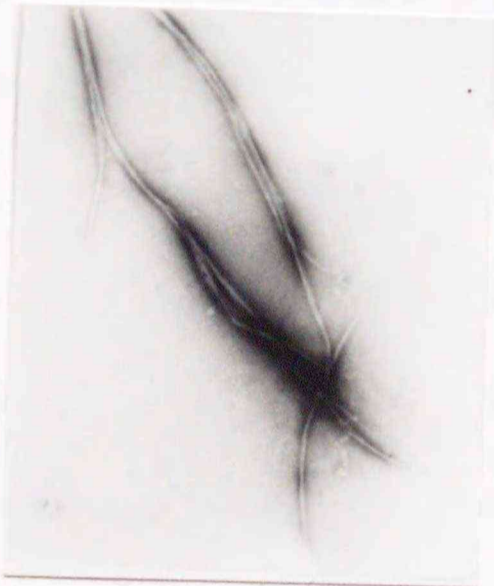
(A) a



b



(B) a



b

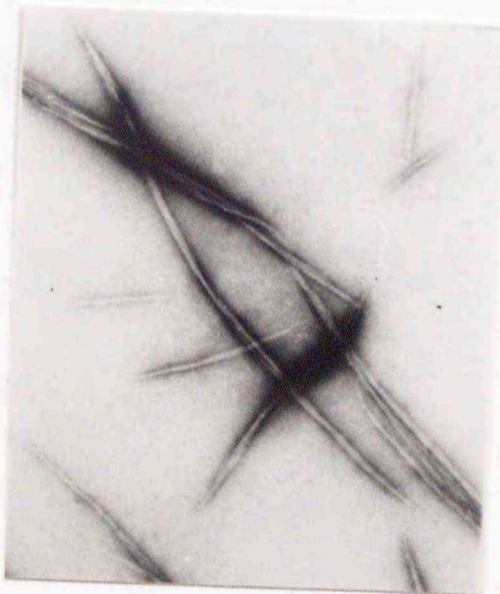


Fig. 55. Electron micrographs of the filament of carboxyl modified carp rod with EDC.

Carp rod modified with 3 mM EDC as in Fig 54 was used. Filaments of unmodified rod (A) and modified rod (B) were allowed to form under the conditions of 0.075 M KCl at either pH 7.0 (a) or 7.5 (b).

EDC 修飾 rod のフィラメント形成能を pH 条件を変えて検討した。Fig. 55 に示した実験で用いたのと同じ rod を瞬間希釈法により 0.075 M KCl (pH 6.0~8.0) 条件下でフィラメントを形成させ、その懸濁液の光散乱強度を測定した。その結果を Fig. 56 に示す。pH 6.0 でフィラメント形成させた場合には非修飾 rod でも非常に高い濁度を示し、EDC 修飾による効果はあまり見られなかった。しかし、pH 7.0 以上でフィラメント形成させた場合、言い替えると非修飾 rod の示す濁度が低い場合には EDC 修飾の程度が大きくなるほど濁度が上昇していった。以上の結果より、負電荷を少なくする事によりフィラメント形成が改善される事が明らかとなった。特に pH 7.5 以上では機能改善が顕著にみられたので、負電荷を低下させた効果はアルカリ条件におけるフィラメント形成時の場合に大きく発揮されると判断した。

また、この図から pH 依存性を推測すると、非修飾 rod のフィラメント形成能は pH によってかなり異なり、pH 6.0 と 8.0 の時の濁度の差は非常に大きかった。これに対し、rod を EDC 修飾していくと pH による濁度の差が小さくなる傾向にあった。特に EDC 3 mM では pH 8.0 でも高い濁度を示し、結果としてどの pH でも同じように良くフィラメントを形成するようになった。この結果は電子顕微鏡観察結果 (Fig. 55) と一致している。

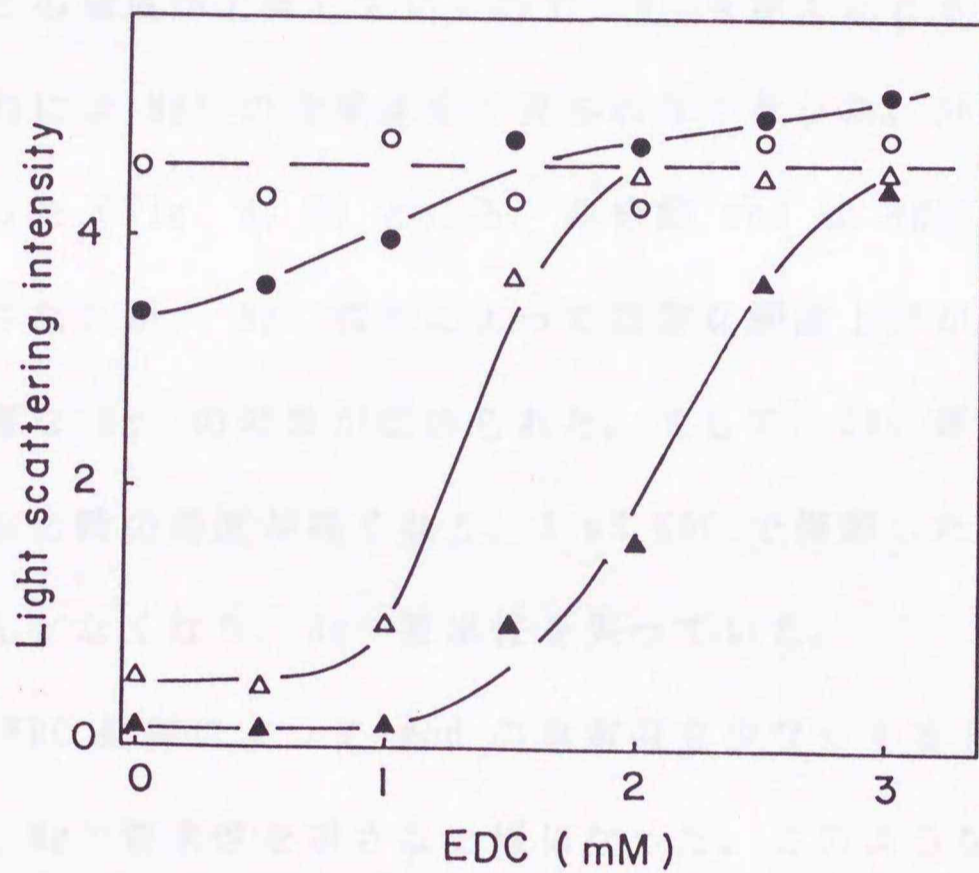


Fig. 56. Effect of carboxyl modification of carp rod on its assembling ability.

Light scattering intensities of modified rods with using EDC concentration as in Fig. 54 were measured at 0.075 M KCl and various pHs. pH 6.0, (○); 7.0, (●); 7.5, (△); 8.0, (▲).

次に、フィラメント形成における  $Mg^{2+}$  の効果を調べた。非修飾 rod 及び 1 mM あるいは 3 mM EDC で修飾した rod を 0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) の条件下でフィラメントを作らせ、それに  $Mg^{2+}$  を添加していったときの濁度変化を調べた (Fig. 57 A)。非修飾 rod は既に述べたように  $Mg^{2+}$  未添加の時は濁度は低いが、 $Mg^{2+}$  濃度に依存して濁度上昇が起こった。しかし EDC 修飾した rod は  $Mg^{2+}$  の効果が小さくなっていった。すなわち、EDC 修飾していくと  $Mg^{2+}$  がいないときの濁度が上昇していくので  $Mg^{2+}$  を加えたときの濁度上昇幅は小さくなり、最終的には  $Mg^{2+}$  の効果は全く見られなくなった。pH 7.5 の条件でも同様の実験を行った (Fig. 57 B) ところ、非修飾 rod は  $Mg^{2+}$  がいないときにはほとんど濁度を示さないが、 $Mg^{2+}$  添加によって急激な濁度上昇が見られ、pH 7.0 の場合よりも顕著な  $Mg^{2+}$  の効果が認められた。そして、EDC 修飾の程度が増すにつれ、 $Mg^{2+}$  未添加の時の濁度が高くなり、3 mM EDC で修飾したものでは  $Mg^{2+}$  の添加効果はほとんどなくなり、 $Mg^{2+}$  要求性を失っていた。

以上より、EDC 修飾によって rod の負電荷を少なくすると、フィラメント形成能が改善し、 $Mg^{2+}$  要求性を示さない様になった。このようなフィラメント形成上の特徴は 40k LMM のフィラメント形成能と類似しているため、40k LMM の機能特性は負電荷が少ないことに由来するという先の推測が支持された。

さて、rod の負電荷を少なくした事によるフィラメント形成能の改善効果は  $Mg^{2+}$  非存在下で顕著に現れたが、同様に pH が高いときにその効果が現れた (Fig. 56)。換言すれば、負電荷の少ない rod は  $Mg^{2+}$  非存在下でも、またどの pH でもフィラメントを形成するようになった。例えば Fig. 57 を見ると、非修飾 rod の  $Mg^{2+}$  要求性は pH 7.0 と 7.5 で異なるのに対し、3 mM EDC で修飾した場合はどちらの pH でも同じ濁度変化を示していた。このことから、rod の負

電荷を少なくすると  $Mg^{2+}$  要求性だけでなく pH 依存性をも失う事が示唆された。

この点については後に検討する。

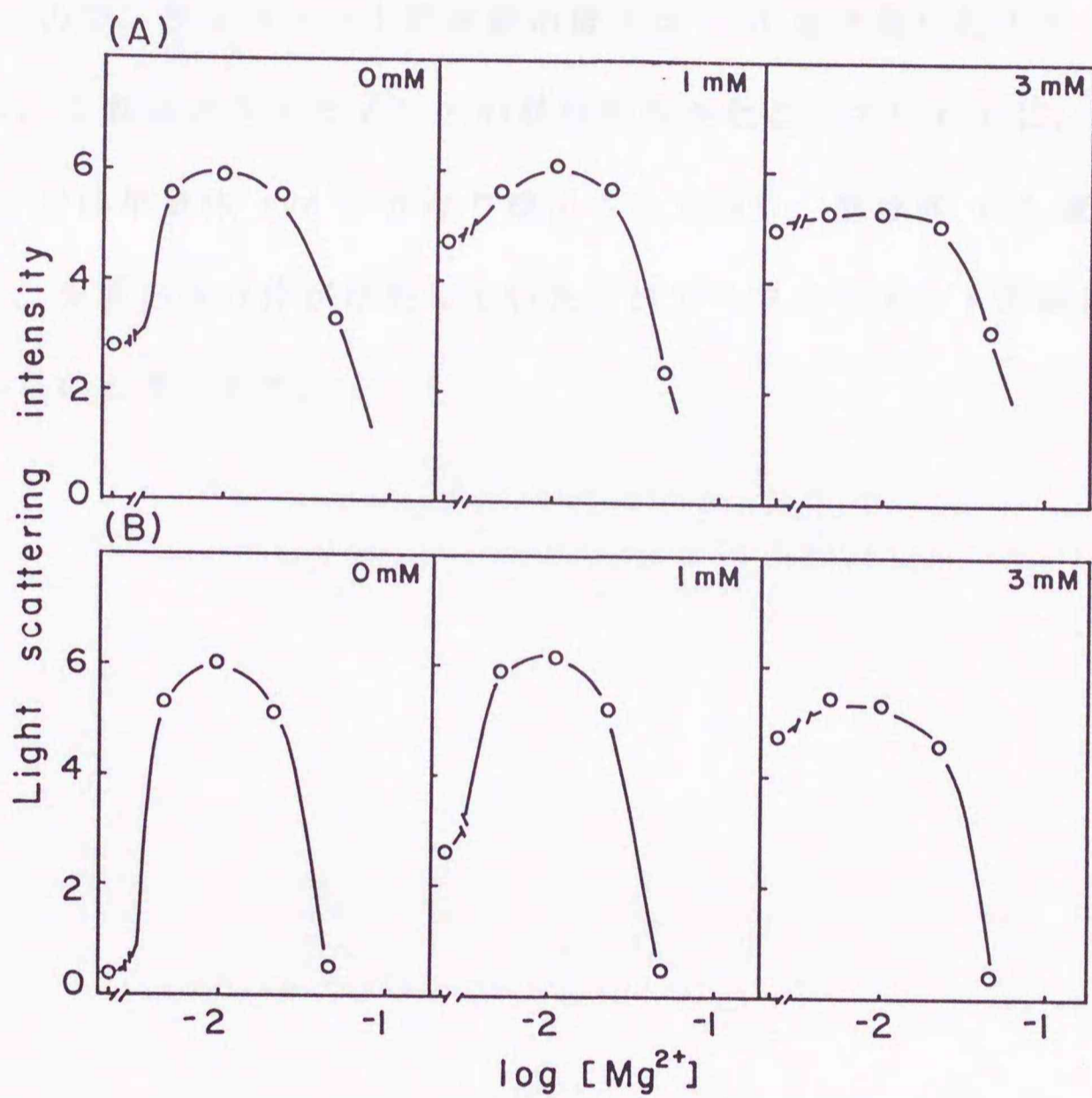


Fig. 57. Effect of  $Mg^{2+}$  on the filament formation of carboxyl group modified carp rod.

Carp rods modified with either 1 mM or 3 mM EDC in the presence of 0.4 M GEE as described in Fig. 54 were used. Light scattering intensities of rod suspension in a medium of 0.075 M KCl, pH 7.0 (A) or pH 7.5 (B) were measured in the presence of various concentrations of  $Mg^{2+}$ .

なお、GEE 非存在下で EDC 反応を行うと rod 分子間でも架橋反応が起こったが、そのような rod のフィラメント形成能についても検討した。Fig. 58 に示した結果から EDC 濃度の上昇と共に濁度が減少していき、フィラメント形成ができなくなっていくのが判った。特に、EDC 濃度が 10 mM の時には pH 7.0でも濁度が検出されず、酸性の条件下でもフィラメント形成能が著しく低下していた。この rod には単量体のみならず分子間で架橋されてできた重合体も含まれていた (Fig. 52) ので、フィラメント形成能の低下は rod 重合体に起因すると思われた。ただし、これほどフィラメントの形成阻害が起こっているのに、SDS-PAGE (Fig. 52) では単量体 rod がかなり検出されており、重合体 rod 量は少なかった。従って、少量の重合体が存在していただだけでもフィラメント形成に与える影響は大きいものと考えられた。

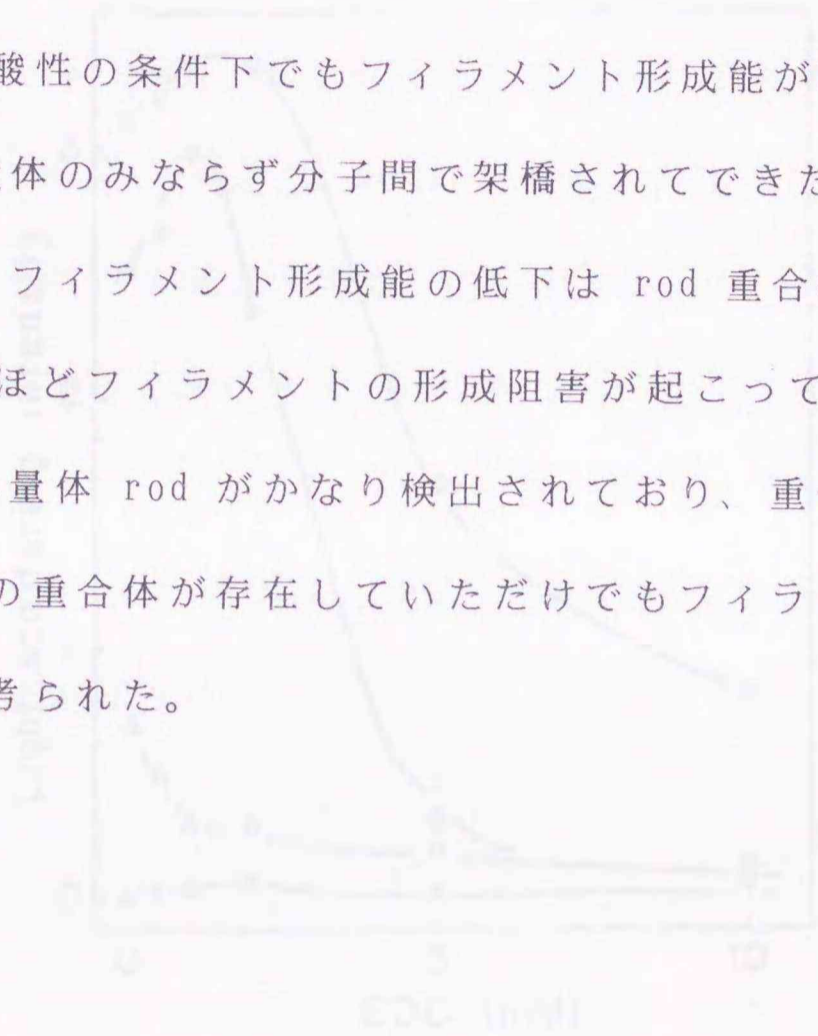


Fig. 58. Effect of EDC concentration on the turbidity of rod solution. The turbidity was measured at pH 7.0 (○) and pH 5.0 (●). The concentration of rod was 1.0 mg/ml. The EDC concentration was 0, 5, and 10 mM. The turbidity was measured at 600 nm.

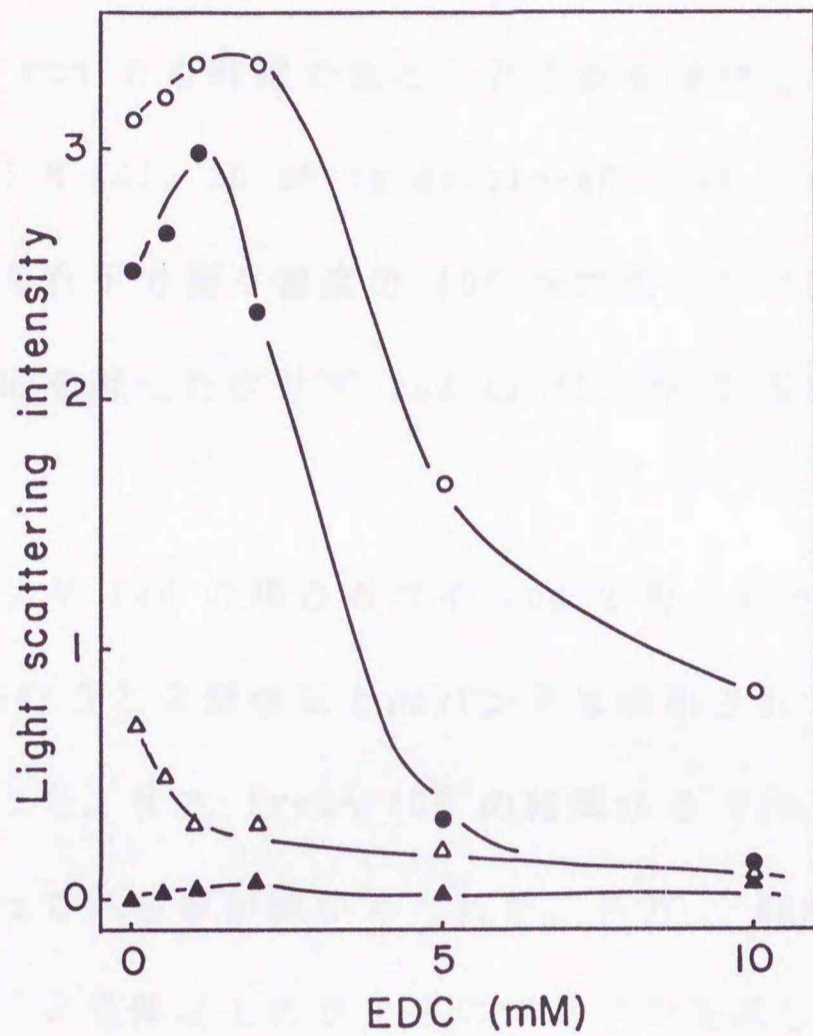


Fig. 58. Effect of EDC treatment in the absence of GEE on the assembling ability of carp rod.

Carp rods treated with various concentrations of EDC without GEE as described in Fig. 52 were used. The medium for suspending rod was the same as Fig. 56. Symbols indicating pH of the suspension are also the same as in Fig. 56.

(2) カルボキシル基修飾によるウサギ rod のフィラメント形成能の変化

コイ rod を GEE 存在下で EDC 修飾する事によってフィラメント形成能を改善し、40k LMM の様に  $Mg^{2+}$  要求性を失わせる事に成功した。これらの結果がコイのみならずウサギ rod でも同様であるかどうかを検討した。

ウサギ rod (0.5 M KCl、20 mM imidazole-HCl (pH 7.0)、1 mg/ml) に 0.4 M GEE 存在下及び非存在下で種々濃度の EDC を加え、25 °C で1時間修飾反応を行った。この修飾反応を行ったウサギ rod の SDS-PAGE 及び Urea-PAGE 図を Fig. 59 に示す。

それによるとウサギ rod の場合もコイ rod で得られた結果と同様に、GEE 存在下で EDC 修飾を行うと2量体以上のバンドは検出されず、分子内架橋しか起こっていない事が判った。また Urea-PAGE の結果から rod の移動度が小さくなり負電荷が小さくなっている事が確かめられた。一方、GEE 非存在下で EDC 修飾を行った場合には、2量体以上のサイズのバンドが生成し、分子間に架橋が起こっている事が示された。しかし、Urea-PAGE 上では移動度は変化していないので、電荷変化は起こっていない事が判った。これもコイ rod の場合と同じ結果であった。

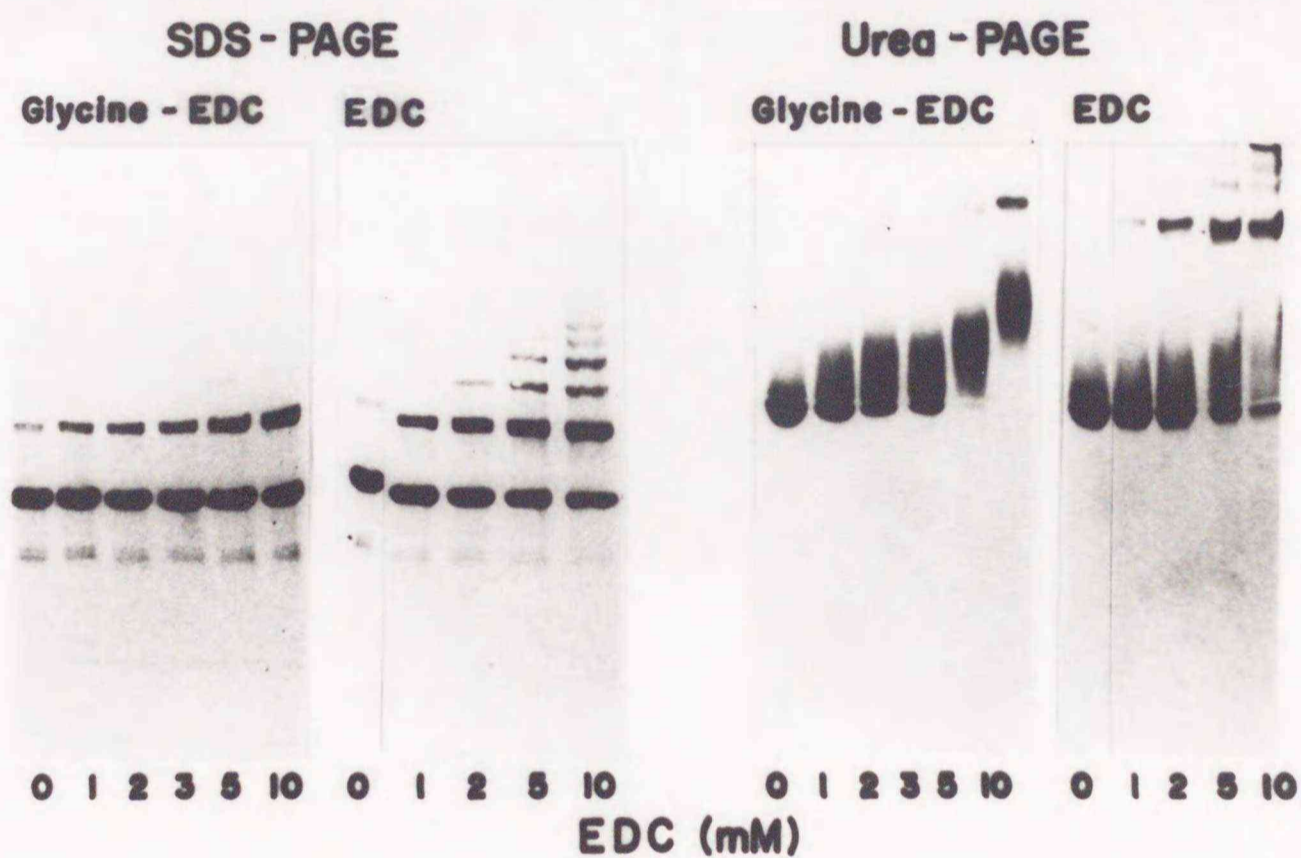


Fig. 59. SDS-PAGE and urea-PAGE of rabbit rod modified by EDC in the presence or absence of GEE.

Rabbit rod in 0.5 M KCl and 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0) was incubated with various concentrations of EDC in the presence or absence of GEE at 25 °C for 1 hr. SDS-PAGE and urea-PAGE were carried out as described in Fig. 52. Glycine-EDC and EDC indicate the modification in the presence and absence of 0.4 M GEE, respectively.

次に、これら修飾 rod のフィラメント形成能について検討した。0.1 M KCl、pH 6.5~8.0 の条件下で瞬間希釈法によりフィラメントを形成させ、その光散乱強度を測定した (Fig. 60)。GEE 存在下で EDC 修飾を行った場合、非修飾 rod がフィラメント形成し易い pH 6.5 及び pH 7.0 では EDC 修飾の効果は認められないが、微アルカリ条件 (pH 7.5 及び pH 8.0) では EDC 修飾が進むにつれて懸濁液の濁度は上昇していき、フィラメント形成が改善されていくのが示された。これもコイ rod の EDC 修飾実験で得られた結果と同じであった。一方、GEE 非存在下で EDC を反応させ、分子間架橋物が生成した rod の場合は、pH 6.5 及び pH 7.0 においてもフィラメント形成できないようになっていった。

次に EDC 修飾による  $Mg^{2+}$  要求性の変化について調べた (Fig. 61)。フィラメント形成条件は 0.1 M KCl、pH 7.0 もしくは 7.5 とした。非修飾 rod では  $Mg^{2+}$  要求性が認められ、その効果は pH 7.5 の方が顕著であった。そして EDC 修飾が進むに従い  $Mg^{2+}$  未添加時の濁度が高くなっていき、ついには  $Mg^{2+}$  の影響を受けなくなった。

以上より、GEE 存在下での EDC 修飾により、ウサギ rod でも負電荷を打ち消す事ができた。そして rod 表面の負電荷を打ち消す事による効果はコイでもウサギでも同様であり、フィラメント形成能は改善し、 $Mg^{2+}$  の促進効果を必要としなくなった。

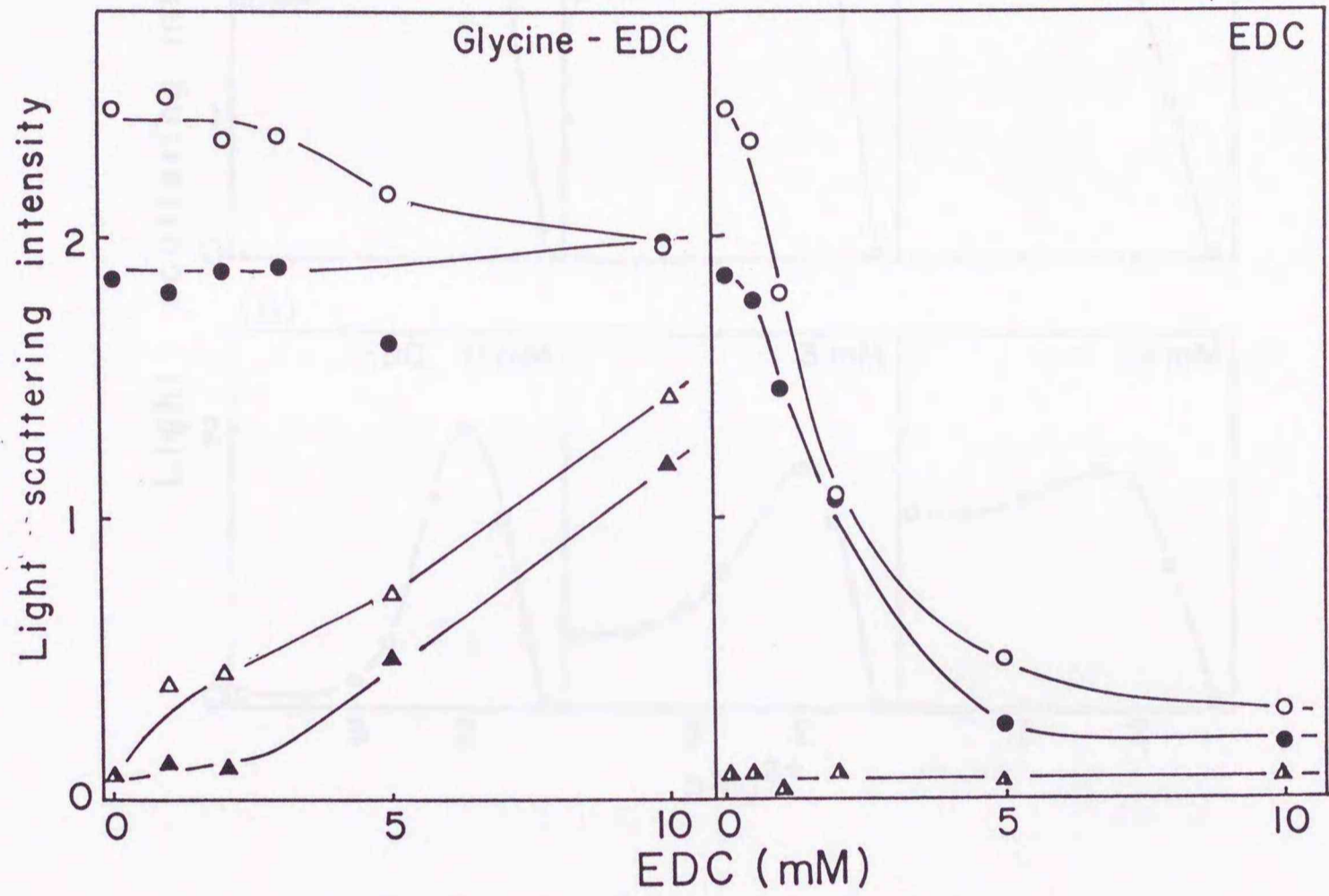


Fig. 60. Effect of modification of rabbit rod with EDC in the presence or absence of GEE on the assembling properties. The same modified rabbit rods as shown in Fig. 59 were used. Glycine-EDC and EDC are also the same. The conditions for suspending rod were 0.1 M KCl and at pH 6.5 (○), 7.0 (●), 7.5 (△) and 8.0 (▲).

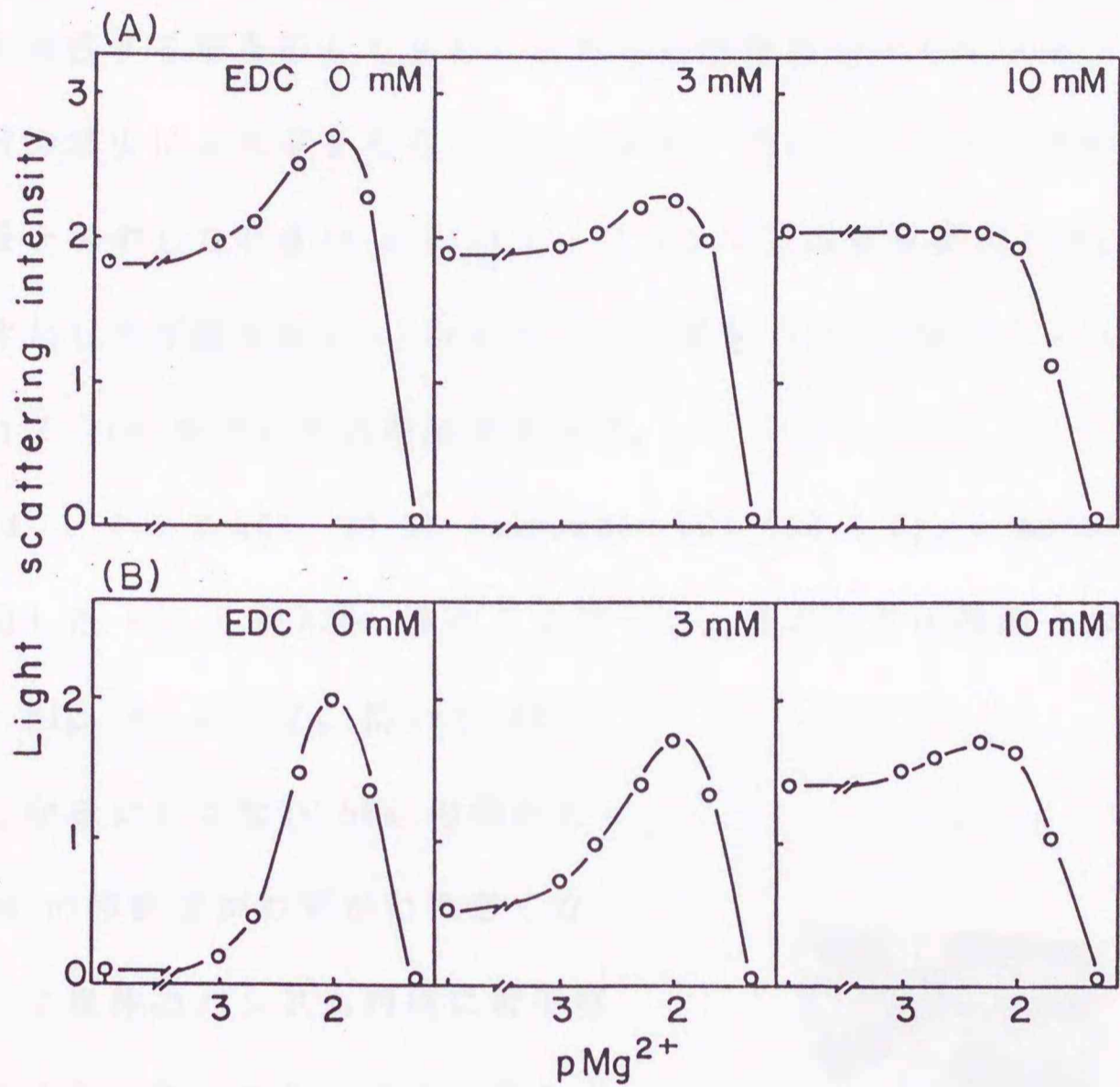


Fig. 61. Effect of  $Mg^{2+}$  on the filament formation of carboxyl group modified rabbit rod.

Modified rods with EDC as in Fig. 59 were prepared, and the light scattering intensities of rod suspension at 0.1 M KCl and pH 7.0 (A) or 7.5 (B) were measured in the presence of various concentrations of  $Mg^{2+}$ .

### (3) アミノ基修飾によるコイ rod のフィラメント形成能の変化

EDC を用いた rod のカルボキシル基修飾により負電荷を打ち消すと、フィラメント形成が改善する事を示してきた。これらの機能変化がカルボキシル基修飾による負電荷の減少による事を明らかにするため、次にアミノ基を修飾し、相対的に負電荷量を増やしたときの rod のフィラメント形成能を検討した。カルボキシル基供与体としてギ酸を用い、rod のアミノ基を EDC を用いてブロックした。ここではコイ rod を用いた実験結果を示す。

コイ rod ( 0.5 M KCl、20 mM imidazole-HCl (pH 7.0)、1 mg/ml ) の EDC 修飾を中和した 0.2 M HCOONa 存在下で行った。そのときの修飾 rod の Urea-PAGE 図を Fig. 62 に示す。用いる EDC 濃度が高くなるにともない GEE の場合とは逆に rod の移動度がわずかに大きくなっていった。2量体のバンドも同様に若干移動度が大きくなった。これはアミノ基の正電荷がブロックされ、相対的に負電荷量が増えた為と思われた。なお、図示しないがこのとき分子間架橋が起こっていない事は SDS-PAGE により確認している。

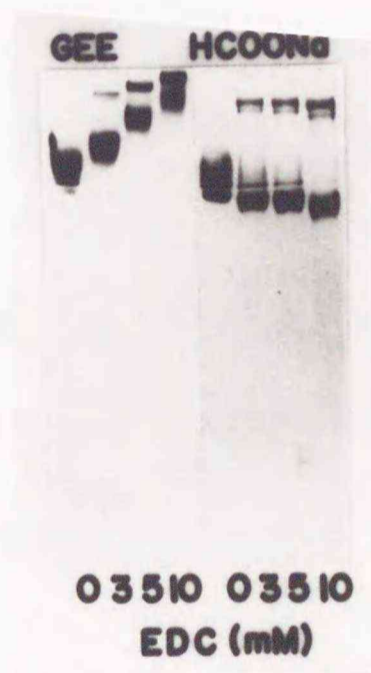


Fig. 62. Change in urea-PAGE pattern of EDC-modified rod with HCOONa.

Carp rod was treated with various concentration of EDC in the presence of with 0.4 M GEE or 0.2 M HCOONa. Urea-PAGE was carried out as described in Fig. 52.

次にアミノ基の EDC 修飾が rod のフィラメント形成能に及ぼす影響を検討した (Fig. 63)。微酸性条件下で非修飾 rod は良くフィラメントを形成し、高い濁度を示したが、2 mM 以上の EDC でアミノ基を修飾すると濁度が減少していった。そして 3 mM EDC で修飾した rod は pH が 6.5 よりも高い条件では濁度はほとんど検出されなくなった。この結果は先に行ったカルボキシル基の修飾とは全く逆であった。更に、この結果を確認するため、rod のアミノ基修飾がフィラメント形成の pH 依存性に及ぼす影響を調べた。まず、修飾 rod を 0.075 M KCl、20 mM Tris、5 mM maleic acid (pH 約 8.1) の条件下で瞬間希釈し、30 分保持した。その後 0.25 M maleic acid を少量ずつ添加し、徐々に pH を低下させたときの濁度変化を追跡した (Fig. 64)。アミノ基の修飾が進むにつれ最大濁度を示す pH が低下し、依存性が酸性側に移動していった。それと共に、各 pH における濁度の値も低下し、全ての条件下でのフィラメント形成能が低下した事が判った。

更にこのアミノ基がブロックされた rod がフィラメント形成するときの  $Mg^{2+}$  の効果を調べたところ (Fig. 65)、修飾が進むにつれて、 $Mg^{2+}$  未添加の場合の濁度が低下した。また、 $Mg^{2+}$  を加えていくに従って濁度の著しい上昇は認められたが、その最大値は低下していた。そして  $Mg^{2+}$  未添加で濁度が検出されなくなった rod すなわち 3 mM EDC で修飾した rod では  $Mg^{2+}$  を添加しても濁度上昇しなかった。

以上の結果より、rod のアミノ基を修飾すると自己集合能を弱める結果となり、アミノ基修飾 rod は pH を低くしても、また、 $Mg^{2+}$  を添加してもフィラメントが成できなくなった。ここでは図示しないが、ウサギ rod のアミノ基を修飾してもコイ rod の場合と同様の結果が得られた。これらの機能変化はカルボキシル基修

飾の時に見られた結果とは全く逆のものであった。従って、先に示したフィラメント形成の改善効果は負電荷を打ち消す事によって得られる事を確認した。

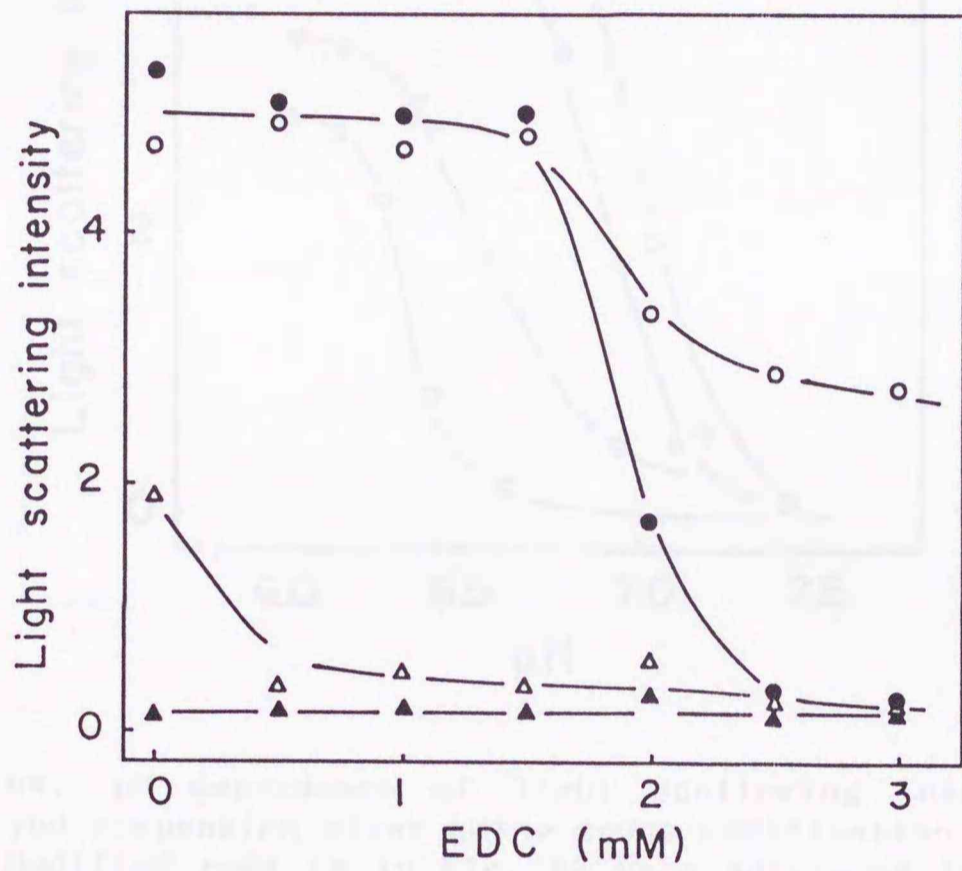


Fig. 63. Assembling ability of amino group modified carp rod.

Amino group modified carp rod was prepared as in Fig. 62. Light scattering intensities of modified rod suspension were measured at 0.075 M and pH 6.0 (○), 6.5 (●), 7.0 (△) and 7.5 (▲).

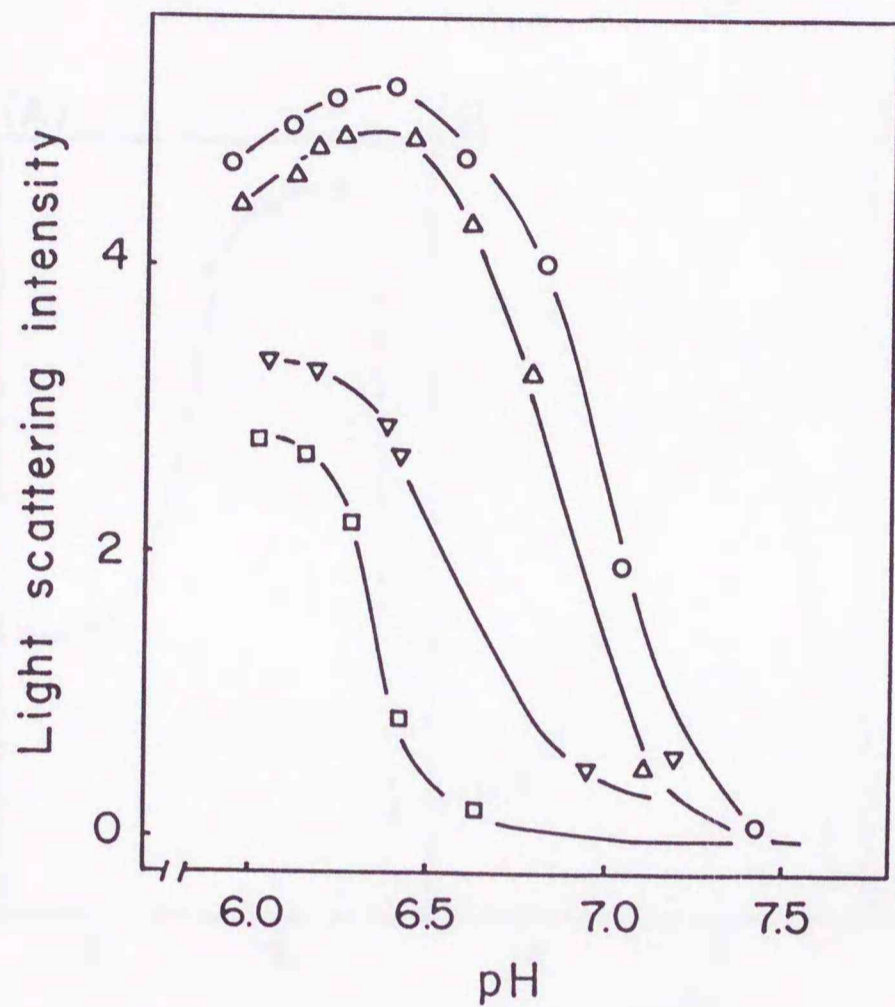


Fig. 64. pH dependence of light scattering intensity of carp rod suspension after amino group modification. Modified rods as in Fig. 62 were suspended in 0.075 M KCl, 20 mM Tris and 5 mM maleic acid (pH 8.1). pH of the rod suspension was lowered by stepwise addition of 0.25 M maleic acid, and the scattering intensity change was followed. Unmodified rod (○), modified rod with 1 mM (△), 2 mM (▽) and 3 mM (□) EDC were used.

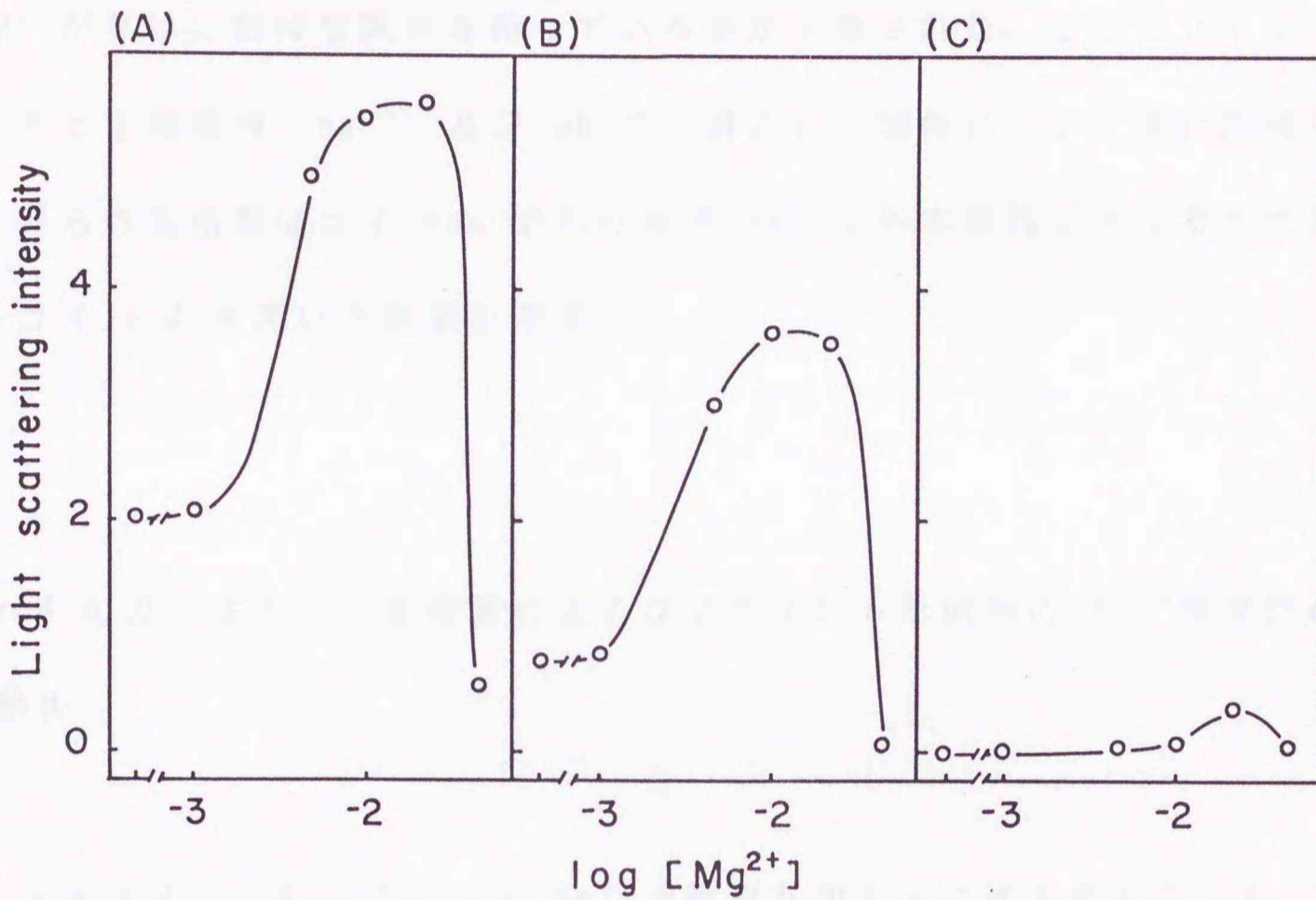


Fig. 65. Effect of  $Mg^{2+}$  on the filament formation of amino group modified carp rod.

The same modified rods as in Fig. 62 were suspended in 0.075 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0). The scattering intensity change upon  $Mg^{2+}$  addition was followed. unmodified rod (A); modified rod with 2 mM (B) and 3 mM (C) EDC.

## 2. フィラメント形成に関わる rod 分子の表面電荷、 $Mg^{2+}$ 、及び pH の関係

ここまでの EDC を用いたカルボキシル基及びアミノ基の修飾により、フィラメント形成には rod 分子表面の電荷が関与している事が考えられ、それに関連して pH や  $Mg^{2+}$  が互いに密接な関係を持っている事が示唆された。そこでフィラメント形成における負電荷、 $Mg^{2+}$ 、及び pH の3者の相互関係について更に詳細に検討した。得られた結果はコイ rod でもウサギ rod でも本質的に同じであったので、以下コイ rod を用いた結果を示す。

### (1) rod のカルボキシル基修飾によるフィラメント形成時の $Mg^{2+}$ 要求性の消失

まず、フィラメント形成における  $Mg^{2+}$  の役割を明らかにするために、1~3 mM の EDC でカルボキシル基を修飾した rod のフィラメント形成能を  $Mg^{2+}$  存在下の場合に注目して検討した。フィラメントの形成条件は 0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、あるいは 0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、10 mM  $MgCl_2$  である。Fig. 66 にその結果を示す。 $Mg^{2+}$  非存在下の場合 (Fig. 66 A) は既に Fig. 56 で示した結果と同様で、カルボキシル基修飾の効果が現れた。それに対して非修飾 rod でも 10 mM  $Mg^{2+}$  が存在すると、pH 条件に関わらず高い濁度を示し、この結果は EDC 修飾の有無に関わらず同じ様にフィラメントを形成している事を示している (Fig. 66 B)。このため、カルボキシル基修飾の効果は  $Mg^{2+}$  未添加の場合にのみ検出される事が判った。先に示したように  $Mg^{2+}$  要求性

非修飾の rod で現れるが負電荷量を減少させると失われるため、 $Mg^{2+}$ とカルボキシル基修飾の効果は相補しているように思われた。このことから rod への  $Mg^{2+}$ の結合と、カルボキシル基の修飾とは同じ意味を持つ事が示唆された。

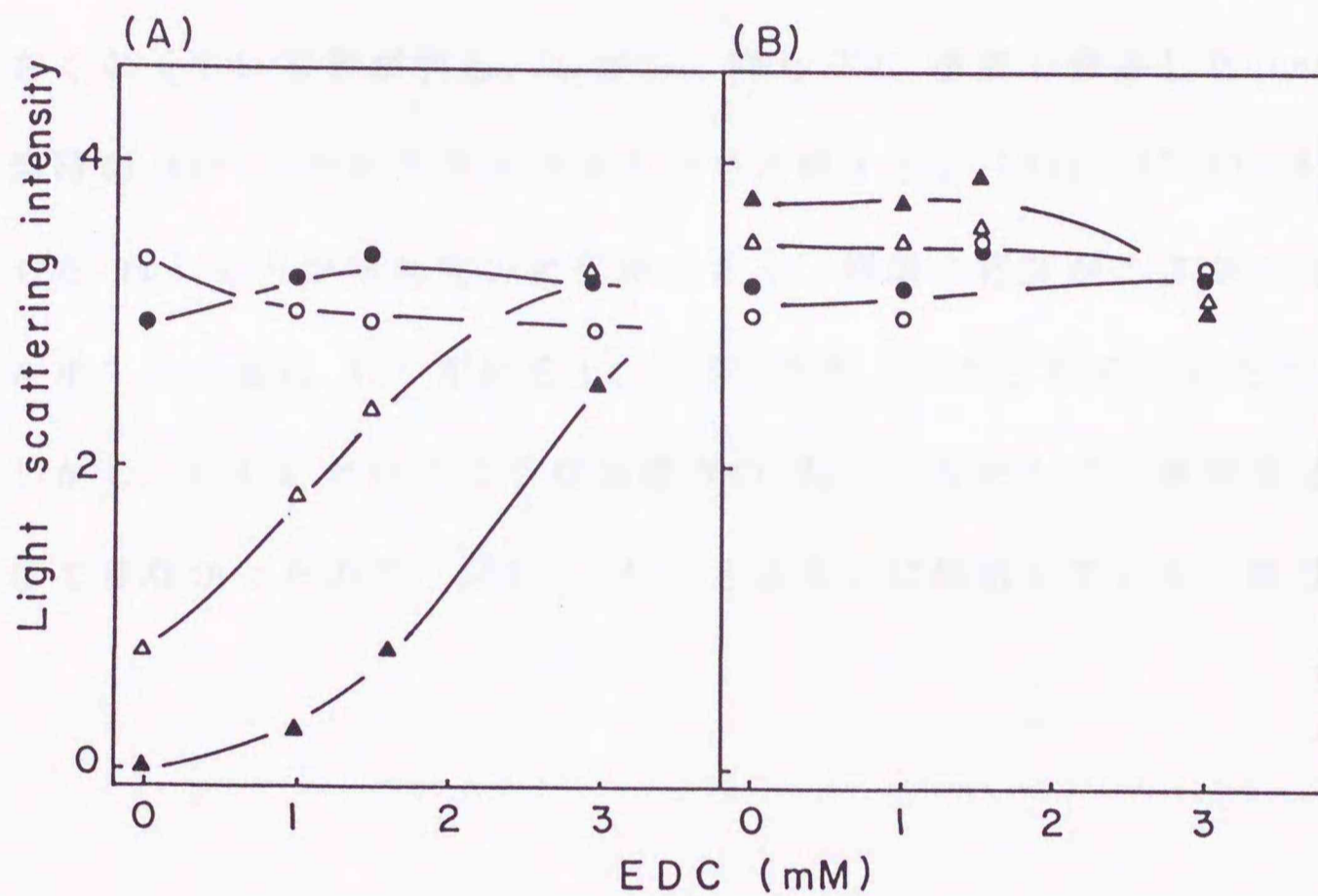


Fig. 66. Effect of carboxyl group modification on the assembly of carp rod in the presence or absence of  $Mg^{2+}$ .

The carboxyl group-modified carp rods were prepared as described in Fig. 54. Light scattering intensity of the modified rod suspension in 0.075 M KCl (pH 6.5-8.0) was measured in the absence (A) or presence (B) of 10 mM  $MgCl_2$ . pH 6.5 (○), 7.0 (●), 7.5 (△) and 8.0 (▲).

そこで rod 分子上の  $Mg^{2+}$  結合部位と EDC 修飾部位の異同を明らかにする為に、rod のカルボキシル基修飾反応に及ぼす  $Mg^{2+}$  の影響を検討した。Fig. 67 に、0.4 M  $MgCl_2$  の共存下、非共存下でカルボキシル基修飾反応を行った場合の rod の Urea-PAGE の結果を示す。

それによると  $Mg^{2+}$  共存下でも EDC 濃度が増えるにつれ rod 及び rod 2 量体のバンドの移動度がやはり小さくなり、カルボキシル基に GEE が架橋されて負電荷が小さくなっている事が判る。しかし、同じ EDC 濃度で修飾した rod の移動度を修飾時の  $Mg^{2+}$  非存在下及び存在下で比較すると (Fig. 67 B)  $Mg^{2+}$  存在下で修飾した rod の方が移動度の変化が小さく、修飾の程度が小さかった。このことはカルボキシル基に  $Mg^{2+}$  が結合し、EDC 修飾が阻害されているためと考えられた。しかし、0.4 M というような高濃度の  $Mg^{2+}$  が存在しても修飾を完全に阻止する事はできなかったため、GEE と  $Mg^{2+}$  とは互いに拮抗している可能性が考えられる。

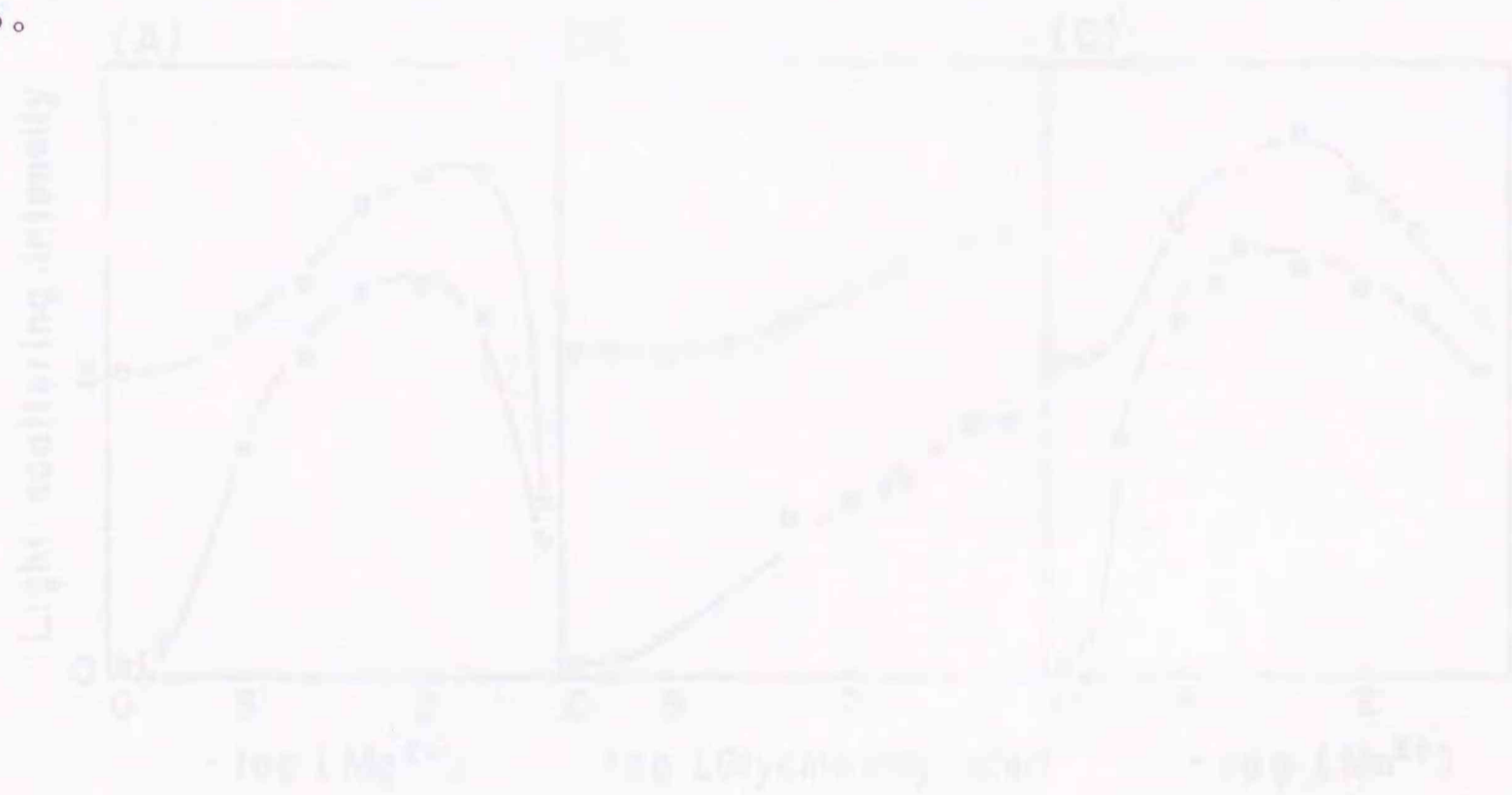




Fig. 67. Effect of  $Mg^{2+}$  on the carboxyl group modification of carp rod.

EDC modification of carp rod was carried out with 0.4 M GEE (Glycine) in the presence or absence of 0.4 M  $Mg^{2+}$ . The urea-PAGE patterns of carp rod modified under above two conditions were compared. Right urea-PAGE patterns are gels to compare the mobility of rod modified in the absence (-) or presence (+) of 0.4 M  $MgCl_2$ .

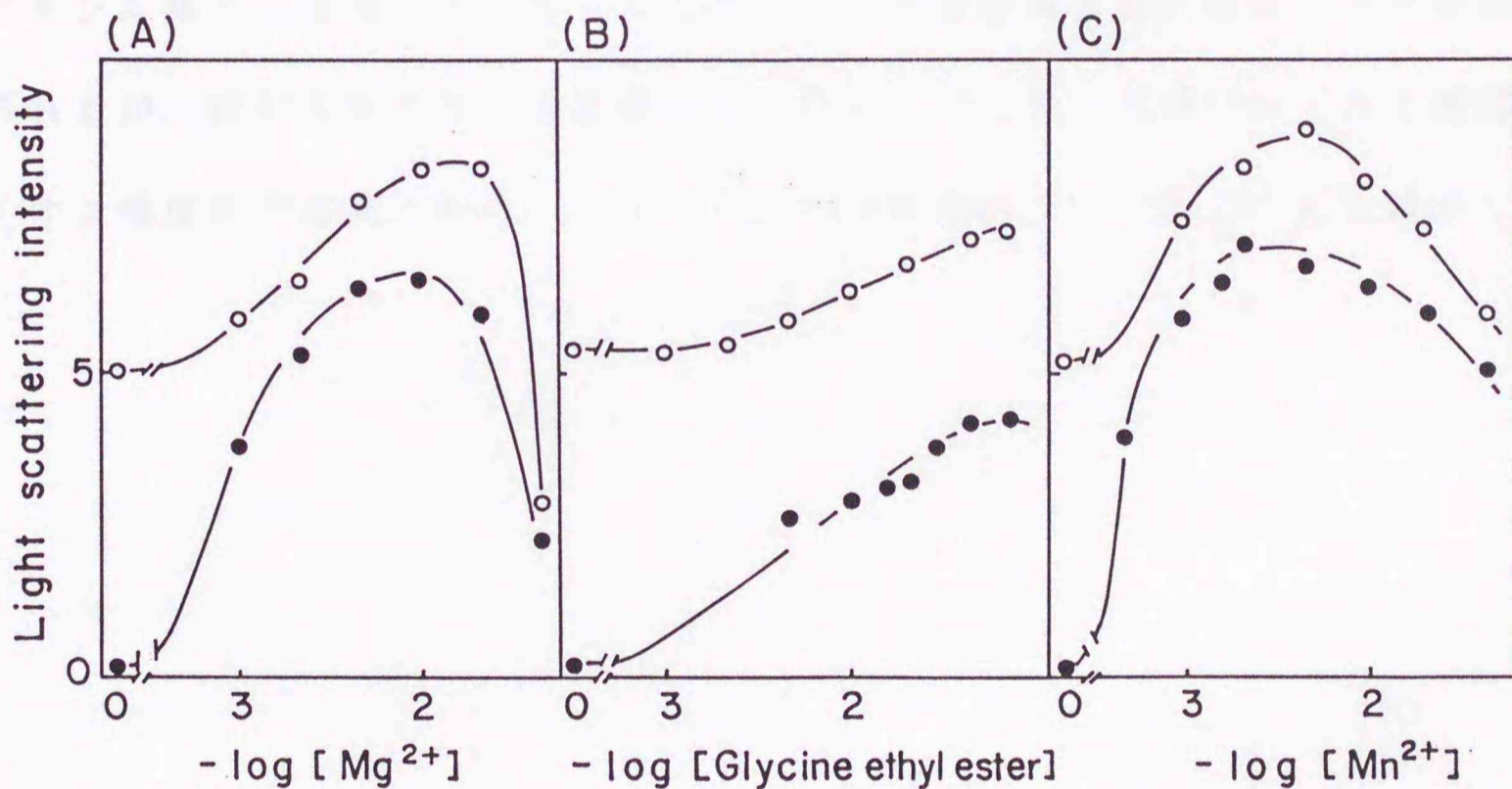


Fig. 68. Effect of  $Mg^{2+}$ , GEE and  $Mn^{2+}$  on the assemble of carp rod.

Carp rod was suspended in a medium of 0.075 M KCl (pH 7.0 or 7.5). The light scattering intensity were followed upon addition of  $Mg^{2+}$  (A), GEE (B) and  $Mn^{2+}$  (C).

rod 上の  $Mg^{2+}$  の結合部位は  $Ca^{2+}$  結合タンパクにおける  $Ca^{2+}$  結合部位の EF-ハンド構造のような特殊な立体構造部位を持たず、分子表面に分布するカルボキシル基そのものであることが示された。そのため、 $Mg^{2+}$  の作用は負電荷を単に減少させるだけであると推定した。そこで  $Mg^{2+}$  以外の種々の 2 価カチオン ( $Mn^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Sr^{2+}$ ) を用いて rod のフィラメント形成に及ぼす影響を調べた。その結果、 $Mg^{2+}$  と同様の効果が  $Mn^{2+}$  に認められ、しかも、 $Mg^{2+}$  よりも低濃度でフィラメント形成を促進する効果を発揮する事が判った (Fig. 68)。しかし、どの 2 価金属でも効果を示すわけではなく、 $Ca^{2+}$  では 0.1 M まで加えたが、全く効果が得られなかった (図示せず)。また、EDC 修飾時にアミノ基供与体として用いた GEE そのものも 0.1 M 付近まで添加するとかなり濁度上昇が認められたがその効果は  $Mg^{2+}$  の場合よりも小さかった (Fig. 68)。この要求性の違いはカルボキシル基との親和力の違いに起因しているのではないかと推測した。つまり、カルボキシル基との親和力が大きいものは比較的 low 濃度で負電荷を打ち消す効果が得られるが、親和力が小さいと高濃度を必要とするため、効果が得られる濃度ではイオン強度の方が高くなり、フィラメントが解集合してしまうことを推測した。

(2) rod のカルボキシル基修飾によるフィラメント形成時の pH 依存性の消失

カルボキシル基を修飾した rod ではフィラメント形成時の pH 依存性が大きく変わり、非修飾 rod で顕著にみられた pH 低下による濁度の上昇が認められなくなる事を述べた。そこでフィラメント形成に及ぼす pH の影響を rod の負電荷と関連づけて検討した。まず、修飾の程度の異なる rod を用い、0.075 M KCl、20 mM Tris、5 mM マレイン酸 (約 pH 8.1) 溶液中で瞬間希釈してフィラメント形成させた。30 分放置後、0.25 M マレイン酸溶液を滴下して pH を低下させていったときの rod 溶液の pH と濁度の関係を検討した。pH を低下させたときにおこる濁度変化はゆっくりとしていたので、一定値に達するまで、長い場合で約 10 分程待つて測定した。このようにして調べた フィラメント形成の pH 依存性を Fig. 69 に示す。

まず、Fig. 69 A では pH とカルボキシル基修飾の関係を示すが、非修飾 rod は pH 8.1 の条件では濁度はほとんど検出されず、マレイン酸を加え pH を低下させていくにつれて濁度は次第に上昇し、pH 6.5 付近で最大値を示した。一方、カルボキシル基を修飾した rod の場合には修飾の程度が大きくなるほどアルカリ側 (pH 8.3 付近) での濁度が大きくなり、その最大値を示す pH もアルカリ側に移動していた。すなわち非修飾 rod では pH 6.5 で最大値が得られたのに、1 mM EDC で修飾した場合には pH 7.0、3 mM EDC で修飾した場合には pH 7.5 付近まで最大濁度を示す pH がアルカリ側に移行した。これらの事実から、カルボキシル基修飾が rod のフィラメント形成与える効果は pH を低下させるのと類似している事が示唆された。

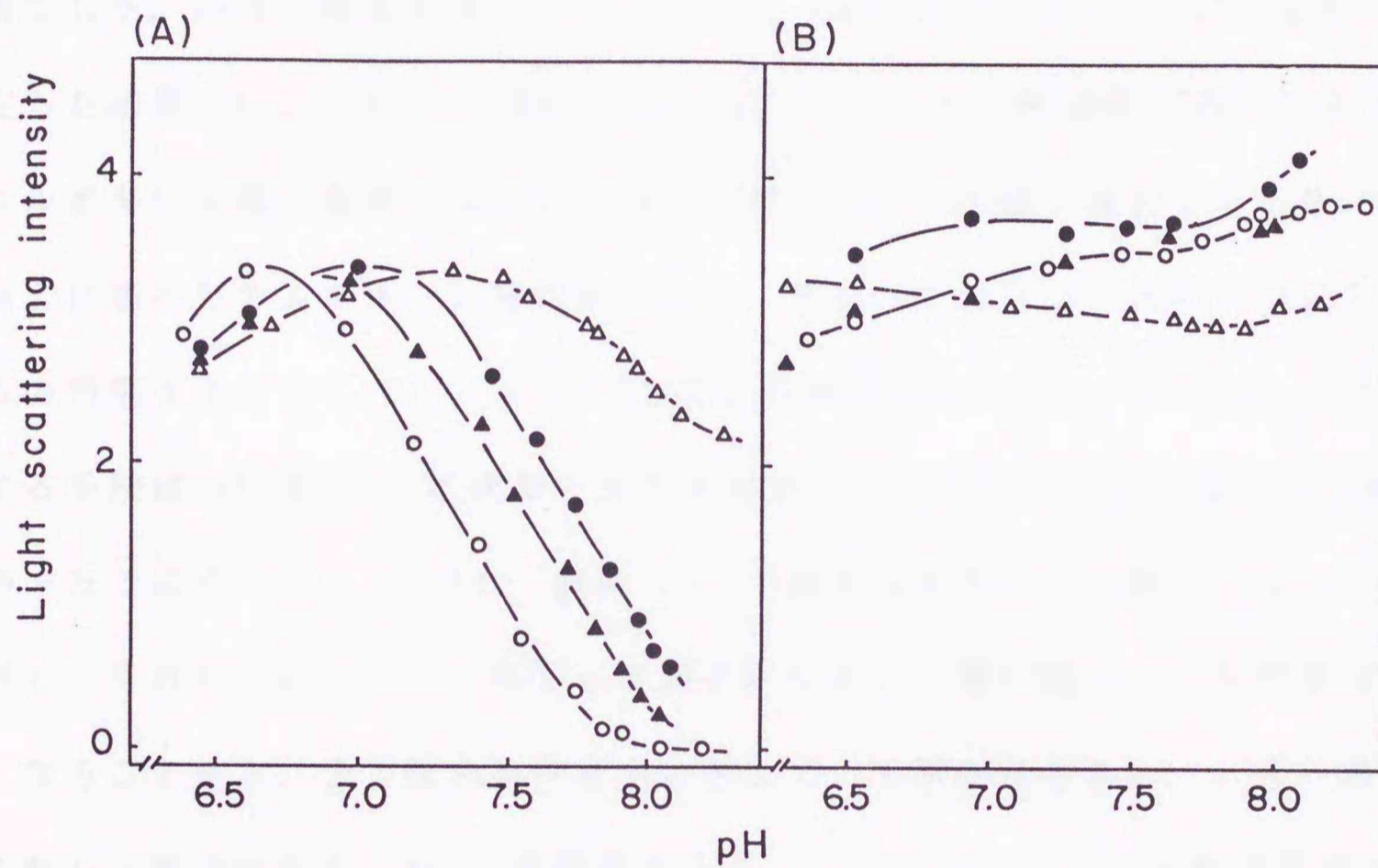


Fig. 69. Effect of carboxyl group modification on the pH dependent assembly of carp rod.

Modification of carboxyl group of carp rod was the same as in Fig. 54. pH dependent light scattering intensity of modified rod suspension at 0.075 M KCl was measured as described in Fig. 64 in the presence (A) or absence (B) of 10 mM MgCl<sub>2</sub>. unmodified rod (○); modified rod with 1 mM (▲), 1.5 mM (●) and 3 mM (△) EDC.

タンパク質の負電荷は酸性アミノ酸の側鎖のカルボキシル基の電離状態に依存することから、pH が低いほど電離しにくくなり、負電荷は小さくなると考えられる。すなわち、pH 低下による効果は rod 表面の負電荷を少なくする事といえる。

さて、前述した通り  $Mg^{2+}$  はカルボキシル基に結合し負電荷を打ち消す作用があり、フィラメント形成に及ぼす  $Mg^{2+}$  の効果と pH の効果は類似の効果であることを推定した。両者の関係を明らかにするため pH の効果を 10 mM  $MgCl_2$  存在下でも測定した結果 (Fig. 69 B)、 $Mg^{2+}$  によってフィラメント形成能の向上した rod はカルボキシル基の修飾の如何に関わらずどの pH でも高い濁度を示した。

以上に述べたカルボキシル基修飾、 $Mg^{2+}$ 、及び pH の 3 つの因子について、それらの効果をまとめて Fig. 70 に示した。非修飾 rod のフィラメント形成を良くする手段は pH を 6.5 程度まで低下させるか、10 mM  $Mg^{2+}$  を添加するかのどちらか一方でよく (Fig. 70 A)、修飾 rod ではそのどちらも必要ではない (Fig. 70 B)。それら 3 因子のうちの 1 つを満足させると、他の因子による効果は見えなくなることから、全て同じ効果をもたらしている事が示された。言い換えるとこれら 3 因子は全て rod の負電荷を小さくして、フィラメント形成阻害を打ち消す役割をはたしていると結論した。

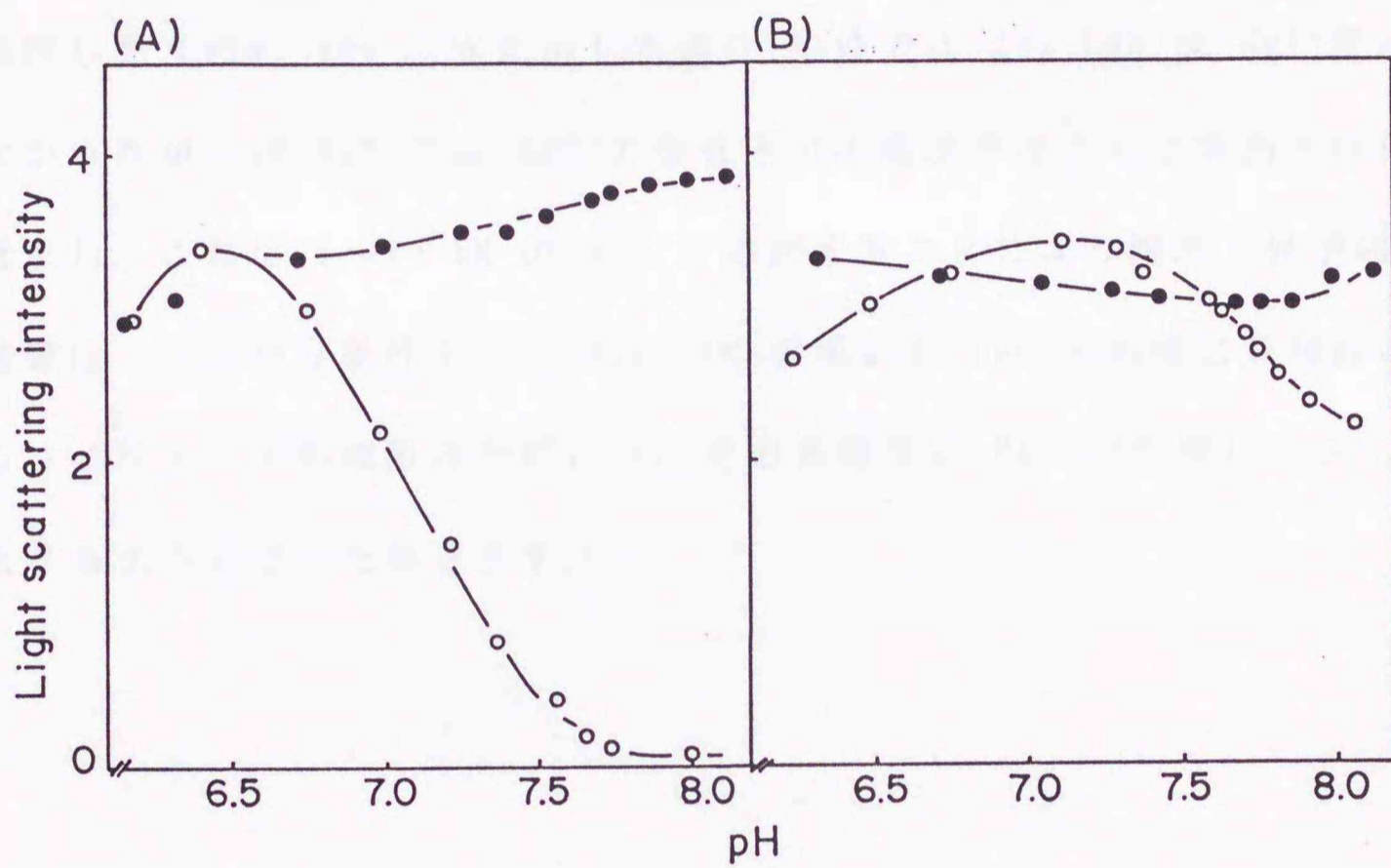


Fig. 70. Relationship among carboxyl group modification, lowering pH and adding  $Mg^{2+}$  on the assembling properties of carp rod.

Light scattering intensities of suspension of unmodified (A) and modified (B) rods were measured in 0.075 M KCl at various pHs in the presence (●) or absence (○) of 10 mM  $Mg^{2+}$ .

### 3. カルボキシル基修飾したコイ 40k LMM のフィラメント形成能

コイ 40k LMM は負電荷が少なく、自己集合能が優れており、 $Mg^{2+}$ 要求性を示さない事を先に述べた。しかし、40k LMM にも酸性アミノ酸は含まれているので、pH 7.0 では電荷バランスがとれていてもアルカリ条件下では負電荷が増すと予想される。そこで 40k LMM のフィラメント形成に対する  $Mg^{2+}$ 要求性を pH を変えて再検討した (Fig. 71)。先に示した通り 中性では 40k LMM は  $Mg^{2+}$ 要求性を示さなかったが、pH 8.0 では  $Mg^{2+}$ 非存在下での濁度がほとんど検出されないまでに低下し、これに 5~10 mM の  $Mg^{2+}$ を添加することにより濁度上昇が起こった。この結果は、アルカリ条件下では 40k LMM の場合も rod と同様に負電荷の増大によるフィラメント形成阻害が起こり、その負電荷に  $Mg^{2+}$ が作用してフィラメント形成するようになった事を示す。

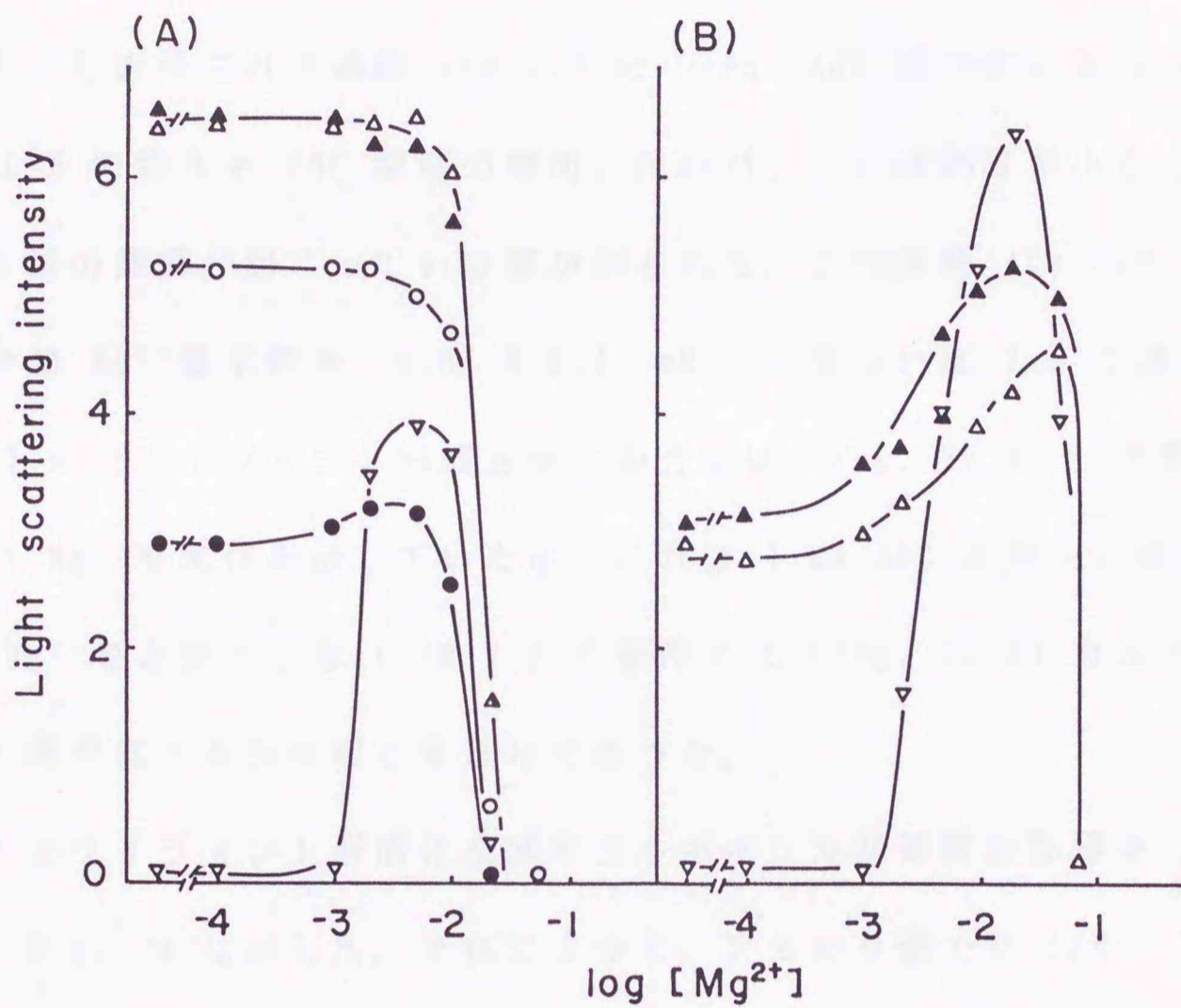


Fig. 71. Effect of pH on the Mg-dependent assembling properties of 40k LMM and 70k LMM on carp.

Carp 40k LMM and 70k LMM were suspended in 0.05 M KCl (pH 6.0-8.0), and the light scattering intensities of the suspension in the presence of various concentrations of  $Mg^{2+}$  were measured. pH 6.0 ( $\Delta$ ), 6.5 ( $\blacktriangle$ ), 7.0 ( $\circ$ ), 7.5 ( $\bullet$ ) and 8.0 ( $\nabla$ ). (A), 40k LMM; (B), 70k LMM.

このように pH によっては 40k LMM でもフィラメント形成時の  $Mg^{2+}$  要求性が発現する事が判ったので、カルボキシル基を修飾して、その  $Mg^{2+}$  要求性を失くすことができるか検討した。反応条件は rod の場合と同じで、40k LMM (0.5 M KCl、20 mM imidazole-HCl(pH 7.0)) に 0.4 M GEE 存在下で種々濃度の EDC を加えた。そのとき得られた修飾 40k LMM の Urea-PAGE 図の変化を Fig. 72 に示す。40k LMM の場合も EDC 濃度の増加に伴いバンドの移動度が小さくなり、カルボキシル基の修飾が起こっている事が示された。この修飾 40k LMM のフィラメント形成時の  $Mg^{2+}$  要求性を、0.05 M KCl、pH 7.0 あるいは 7.5 で調べた (Fig. 73)。pH 7.5 でフィラメント形成させた場合には (Fig. 73 B)、効果はやや小さいものの  $Mg^{2+}$  要求性を示していたが、これは 1 mM EDC を用いた修飾で失われた。元々  $Mg^{2+}$  を必要としない pH 7.0 の条件では (Fig. 73 A) カルボキシル基修飾は単に濁度低下を引き起こすだけであった。

40k LMM のフィラメント形成に及ぼすカルボキシル基修飾の影響を pH を変えて検討し、Fig. 74 に示した。それによると、アルカリ側では (pH 7.5 及び pH 8.0) カルボキシル基の修飾と共に濁度の上昇が認められたが、pH 6.5 や pH 7.0 のときにはむしろフィラメント形成しにくくなる傾向がみられ、Fig. 73 の結果と一致した。更に、カルボキシル基を修飾した 40k LMM のフィラメント形成の pH 依存性を調べたところ (Fig. 75)、修飾により濁度の pH 依存性が失われ、いずれの pH でも同様にフィラメント形成するようにならった。これは rod の場合に得た結果と共通していた。しかし、このときの濁度はアルカリ性での非修飾 40k LMM の値よりは大きいが、酸性域における非修飾 rod の濁度よりはかなり小さかった。先に 40k LMM は side-by-side 方向に集合しやすい性質がある事を示したが、分子表面に GEE が架橋されたため side-by-side の集合が物理的に阻害

されているのではないかと推測した。

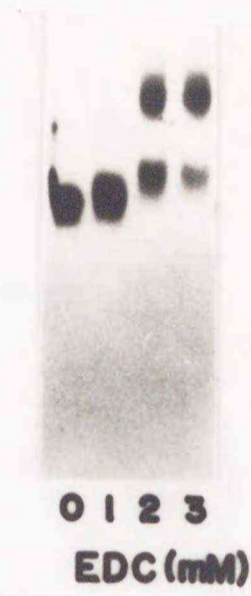


Fig. 72. Urea-PAGE patterns of carboxyl group modified carp 40k LMM.

Carp 40k LMM was treated with EDC in the presence of 0.4 M GEE at 20 °C for 2 hr. Urea-PAGE was carried out as in Fig. 30.

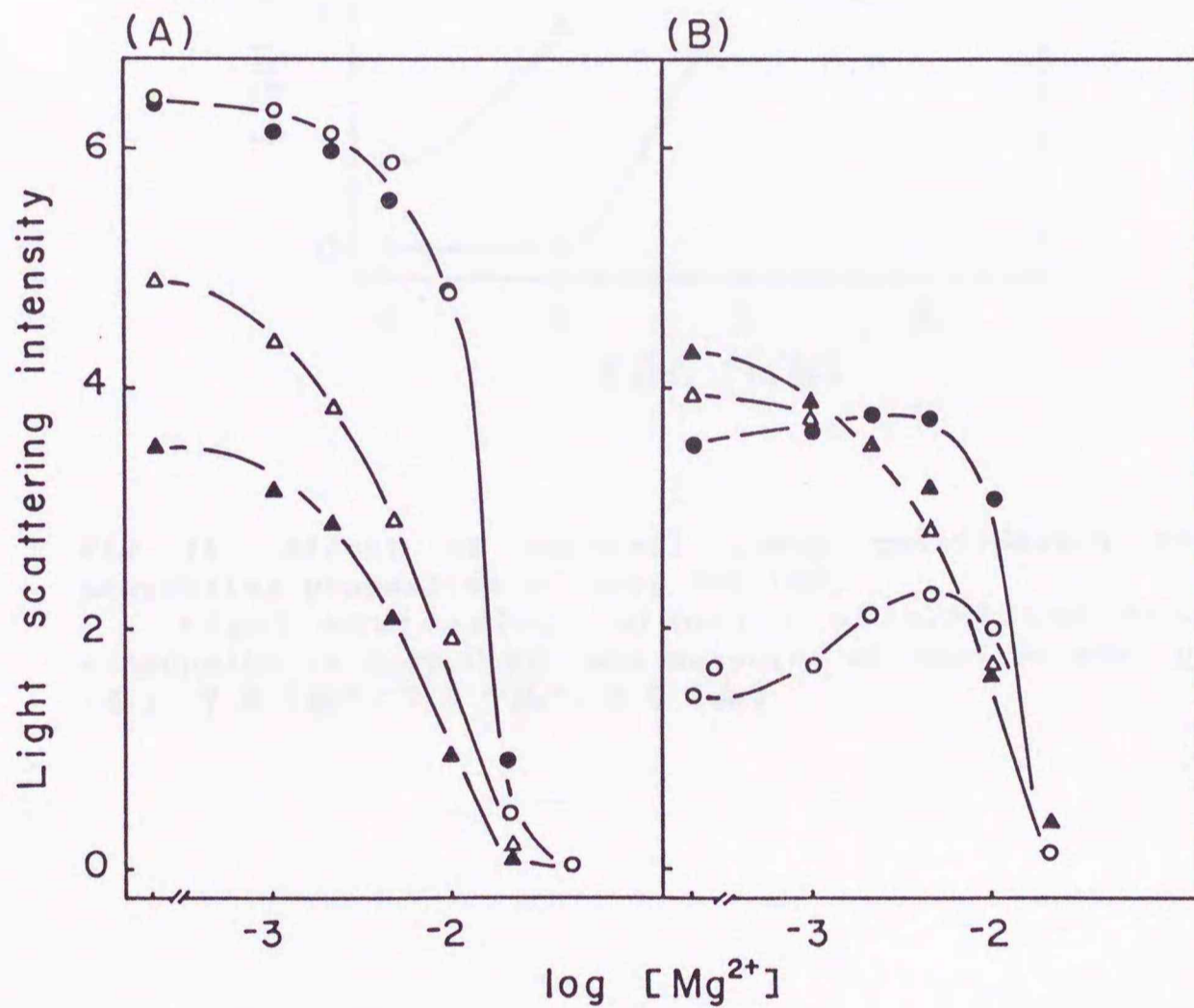


Fig. 73. Effect of  $Mg^{2+}$  on the assembling properties of carboxyl group modified carp 40k LMM.

Carboxyl group of 40k LMM was modified as in Fig. 72 and then suspended in 0.05 M KCl at pH 7.0 or 7.5. Light scattering intensity change upon  $Mg^{2+}$  addition was measured. (A), 0.05 M KCl (pH 7.0); (B) 0.05 M KCl (pH 7.5). Unmodified 40k LMM, (○); modified 40k LMM with 1 mM (●), 2 mM (△) and 3 mM (▲) EDC.

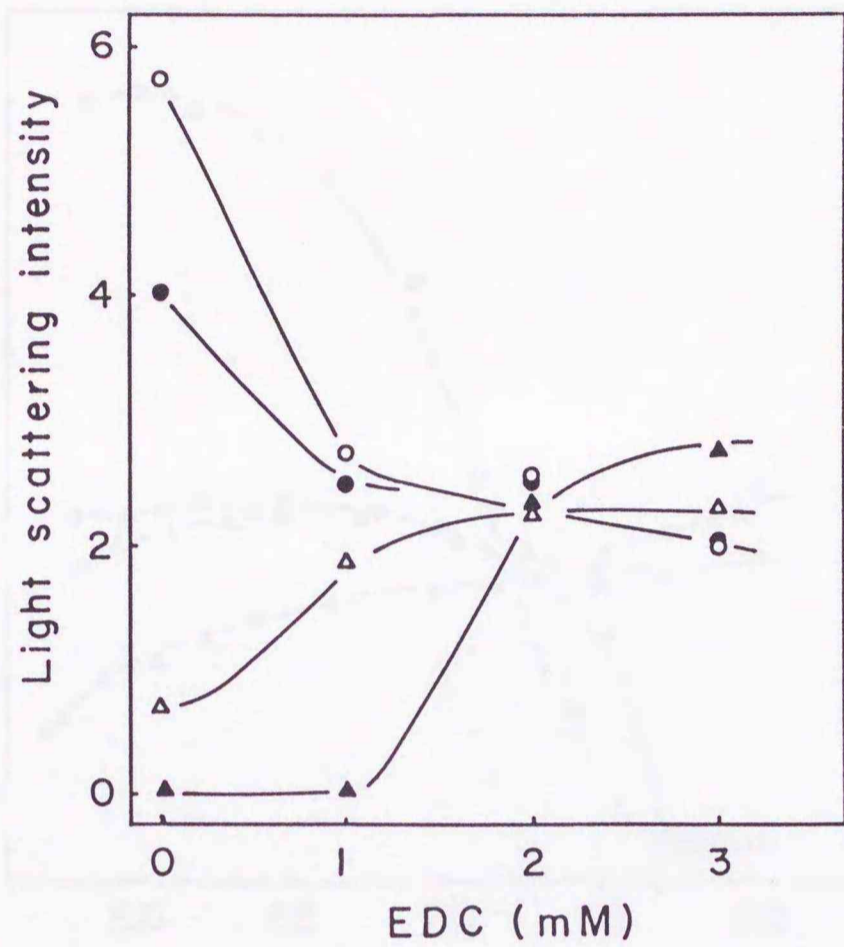


Fig. 74. Effect of carboxyl group modification on the assembling properties of carp 40k LMM.

Light scattering intensity of modified 40k LMM suspension at 0.05 M KCl was measured at various pHs. pH 6.5 (○), 7.0 (●), 7.5 (△), 8.0 (▲).

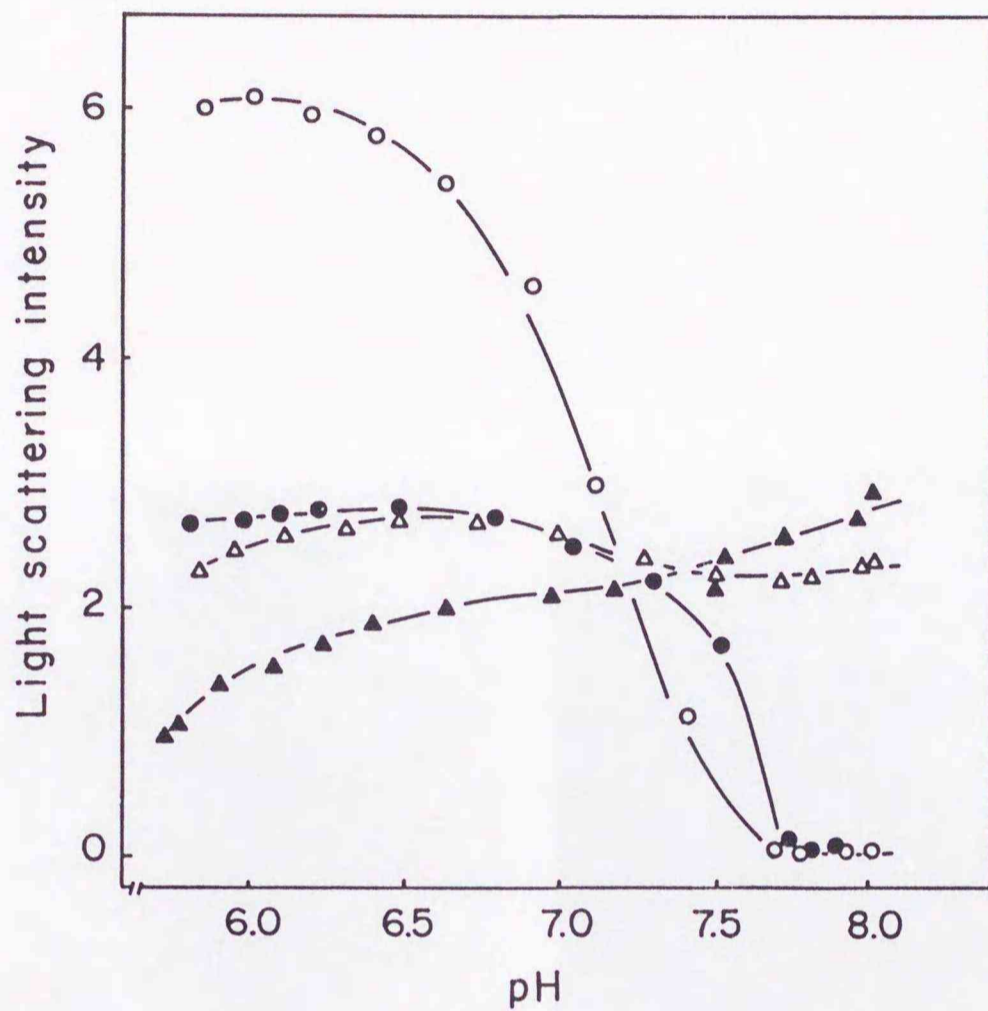
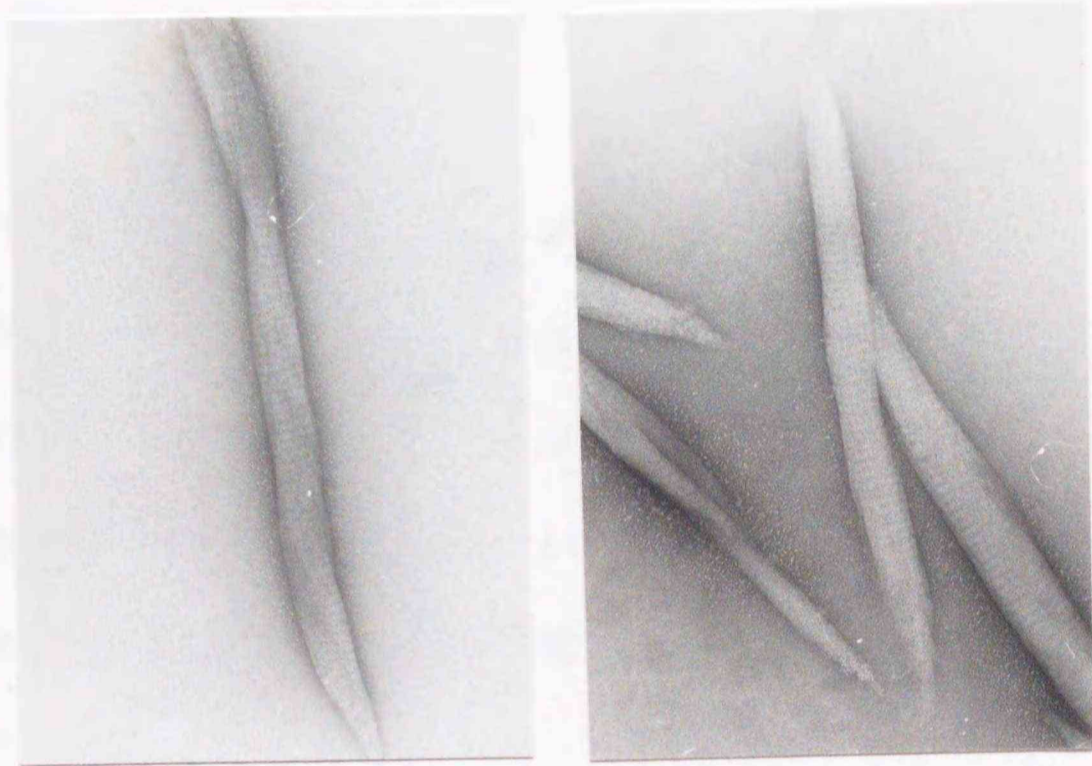


Fig. 75. Effect of carboxyl group modification on the pH dependent assembling properties of 40k LMM.

Light scattering intensity of modified 40k LMM suspension at 0.05 M KCl and at various pHs was measured as described in Fig. 65. Unmodified 40k LMM, (○); modified 40k LMM with 1 mM (●), 2 mM (△) and 3 mM (▲) EDC.

なお、修飾 40k LMM の形成するパラクリスタル (0.075 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)) を電子顕微鏡観察したところ (Fig. 76)、同条件の非修飾 40k LMM の形成するパラクリスタル (Fig. 33) よりも横幅の狭いものを形成していた。



0.1 μm

Fig. 76. Electron micrograph of paracrystal of carboxyl group-modified 40k LMM.

Paracrystal of carboxyl group-modified 40k LMM with 3 mM EDC was allowed to form as in Fig. 45.

#### 4. 小考察

カルボキシル基の化学修飾にカルボジイミドを用いる手法はよく知られており、最近ではカルボジイミドの一種である EDC を用いてチューブリンのカルボキシル基を化学修飾し、それによる機能変化を研究した例がある (Mejillano & Himes, 1991)。

本研究でも EDC を用いて rod のカルボキシル基を化学修飾する事により、フィラメント形成に及ぼす種々要因 ( $Mg^{2+}$ 、pH、分子表面電荷) の影響を知ろうとした。EDC 修飾時のアミノ基供与体として GEE を用いたが、GEE の代わりに Tris やアミノエタノールを用いて検討したが本質的には同じ結果が得られた。

rod のフィラメント形成に及ぼすカルボキシル基修飾の影響を検討した結果、カルボキシル基を修飾して負電荷を小さくした結果、フィラメント形成能が改善される事が明らかになった。逆に、アミノ基を  $HCOONa$  を用いて EDC 修飾するとフィラメントが形成しにくくなる事が見いだされた。従って、rod がフィラメント形成するためには分子表面の余分な負電荷を打ち消して、電荷のバランスを整える事が重要であると考えられた。

本研究においては EDC で修飾されるカルボキシル基の位置や個数を同定することはできなかつた。修飾 rod の Urea-PAGE によるバンドはブロードであったので、修飾程度の異なる rod の混在した標品であると思われた。修飾 rod のアミノ酸分析により rod に取り込まれた平均 GEE 数を測定した。その結果は非常に誤差が大きいものであったが、アルカリ性でもフィラメント形成する程度にカルボキシル基修飾が進行した rod の場合でも、1 分子あたりせいぜい数残基~10 残基が修飾されている程度であった。ニワトリやウサギの rod のアミノ酸配列が

ら求めた酸性アミノ酸数は全アミノ酸 1080 のうち約 240 であるので、機能改善に必要な修飾カルボキシル基の数はそれほど多くない事になる。

また、rod の修飾カルボキシル基の位置を知るために、修飾 rod を更にキモトリプシン消化し、生成断片の Urea-PAGE 上での移動度変化を調べようとした。EDC による rod サブユニット間の分子内架橋物が混在していたために、バンドの同定は困難であったが、どのバンドの移動度も小さくなるようであった。このことから判断して、rod 上の特殊な部位のカルボキシル基のみが選択的に修飾されているわけではなさそうである。

フィラメント形成における pH や  $Mg^{2+}$  の役割についても rod 表面のカルボキシル基由来の負電荷を打ち消して電荷バランスを調製するという事で説明できた。すなわち、これら 3 つの因子の条件を組み合わせた実験から次の結果が得られた。

- ① カルボキシル基修飾は  $Mg^{2+}$  添加または pH 低下の効果を同じ様に失わせる事、
- ② 非修飾 rod も pH が低い場合、 $Mg^{2+}$  要求性が認められない事、
- ③  $Mg^{2+}$  存在下では pH 依存性が失われる事、
- ④ カルボキシル基修飾した rod は  $Mg^{2+}$  非存在下、微アルカリという最もフィラメント形成しにくい条件でも、十分にフィラメント形成できる事。

このため、pH と  $Mg^{2+}$  の効果は同次元で議論でき、両者ともにカルボキシル基修飾と同様の総電荷を変える役割を果たしていると結論した。pH がフィラメント形成に影響する例として、高イオン強度下のミオシンでも溶液の pH が低ければ (pH 6.0 以下) フィラメントを形成する事 (Godfrey & Harrington, 1970 a, b; Morita, *et al.*, 1987; Choe, *et al.*, 1991) や、水溶性でフィラメント形成能を持たない S-2 でも pH 4 程度まで低下させるとパラクリスタルを形成する事 (Lowey, *et al.*, 1967) が報告されている。これらの結果も、pH を低下させる事による負電荷の減少によってフィラメント形成能が回復した事

を支持すると思われる。

これらの関係は 40k LMM の場合にもあてはめる事ができた。すなわち、中性では  $Mg^{2+}$  要求性を示さない 40k LMM でも、アルカリ条件下では集合能が低下し、 $Mg^{2+}$  要求性を示すようになった。そして、この  $Mg^{2+}$  要求性もカルボキシル基を修飾することで失われた。

ただし、40k LMM の場合は架橋させた GEE が物理的障害となり、フィラメント形成しにくくなるようであった。また、GEE なしで EDC 修飾を行い、分子間架橋による重合物が少量混入した rod もフィラメント形成は著しく低下した。よって、分子集合能は微細な物理的障害で阻害される微妙な性質である事が推測された。

以上の結果より、生体内に近い条件下（中性、 $Mg^{2+}$  存在下）におけるミオシンのフィラメント形成能は rod を構成する 3 つの機能性ドメインによって説明する事ができた。まず、比較的電荷のバランスのとれた C 末端 40k LMM 部分がフィラメント形成ドメインとして機能している。その N 末端側に延びた部分の 20 kDa 部分は負電荷に富み、この負電荷に  $Mg^{2+}$  が作用して、フィラメント形成が調節される、いわばフィラメント形成調節部位である。ここまでが LMM 部分である。更に、N 端部分の S-2 は集合能を有しないが、rod 分子が side-by-side に無制限に集合する事を防ぎ、ミオシンフィラメントを適切な形状に調節する、第 2 のフィラメント形成調節部位といえる。そしてこれらの機能の違いはその分子表面の電氣的構造に基づいていると結論した。このような rod 内でのドメインの機能分担は魚類ミオシンでも哺乳類ミオシンでも共通している。

最後に、rod 分子表面の電荷によってフィラメント形成能を説明してきたが、動物種の違いによるミオシンのフィラメント形成能の違いはこれだけでは説明で

きなかった。例えば、ティラピア・ミオシンはコイよりもフィラメント形成能が劣るが、これから調製した 39k LMM のフィラメント形成能もコイやウサギの場合より劣っていたので、rod の C 末端部分のフィラメント形成ドメインの機能がミオシンの場合にも直接反映していると思われたが、その原因は判らなかつた。ティラピア 39k LMM も IEF 上はコイのものと差は認められず (Fig. 42)、フィラメント形成能の劣る原因は単なる電荷の違いでは説明できなかつた。センチウのパラミオシンの分子集合能はたった 1 個のアミノ酸置換 (Glu から Lys) によって変わる事から (Gengyo-Ando & Kagawa, 1991)、ティラピア・ミオシンでも等電点では区別出来ないくらい微妙な電荷の違いが原因かもしれない。また、フィラメント形成には分子配列上の電荷の周期性の他に、疎水性アミノ酸の周期性も関係する事が考えられるので (McLachlan & Karn, 1982; Atkinson & Stewart, 1991)、アミノ酸組成では検出されない、アミノ酸配列の相違も原因かもしれない。

### 第3章 ミオシンの加熱変性時に起きる構造変化

魚類ミオシンの構造安定性がウサギのものよりも劣っていることはよく知られているが、この安定性に関する研究は ATPase 活性失活を指標とした S-1 部分の構造変化を検出しているものが多い（木村ら、1977 a; 室塚、新井、1976; 室塚ら、1976; Kimura, *et al.*, 1980）。一方、rod 部分の構造安定性に注目して研究した例は少ない。

第1章 第2節において、単離したコイ rod の変性剤（尿素、塩酸グアニジン）に対する抵抗性について S-1 と比較したところ、同じくらいの濃度の変性剤存在下で構造破壊が起こっている事を見いだした。また、コイ rod はウサギ rod よりも低濃度の変性剤で構造破壊が起こる事から、S-1 のみならず rod の立体構造も魚類の方が不安定であることを示した。

本章ではミオシンを加熱したときの構造変化、特に rod 部分の構造変化について、第1章、及び第2章で明らかにした rod の分子内構造と関連させて検討した。またミオシン分子内の S-1 と rod 部分の構造変化は独立して起こるのか、あるいはお互い影響を及ぼしあって起こるのかなど、ミオシンに生じる構造変化について分子内構造のレベルで解析しようとした。

#### 1. 熱変性初期に起こるコイ・ミオシンの凝集反応

魚類ミオシンの加熱変性については種々の検討例があるが、本研究では高イオン強度下で単量体として存在しているコイ・ミオシンを加熱したときに起こる構造変化、特に不可逆的变化について検討した。

(1) Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図形の変化から見たコイ・ミオシンの  
凝集反応

コイ・ミオシンの加熱初期におけるミオシンの分子間凝集反応についてゲル濾過法により検討した。

まず、コイ・ミオシン (0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 28 °C において 0~20 分間加熱処理し、氷冷後、このミオシンを Sepharose CL-4B ゲル濾過に供し、溶出図形の変化を追跡した。Fig. 77 A にそれらの結果を示した。それによると未加熱ミオシンは  $V_0$  より少し遅れた位置に、単一のシンメトリーな単量体ミオシン (モノマーミオシン) のピークとして溶出された。ところが、ミオシンを 28 °C で 5 分加熱した結果、モノマーミオシンのピークの他に  $V_0$  に新たなピークが出現した。更に加熱時間が 10 分になると、それら 2 つのピークの他に、 $V_0$  とモノマーミオシンのピークの間新たなピークが検出された。そして 20 分加熱したミオシンの場合は、モノマーミオシンのピークはもはや 2 番目のピークの肩のようにしか検出できないほど小さくなった。すなわち、加熱により、ミオシンはモノマーからオリゴマーの分子形態に移って行くようであった。

ここには示していないが、例えば 20 分加熱したミオシンでも肉眼的には濁度は全く認められなかったし、このミオシンを超遠心分離 (50,000 x g) した後にゲル濾過に供しても  $V_0$  と第 2 のオリゴマーのピークは検出され、ピークの高さも変わらず、溶出パターンは変わらなかった。それゆえ、オリゴマーといっても超遠心分離で沈澱しないような、かなりサイズの小さなものであることが推定された。

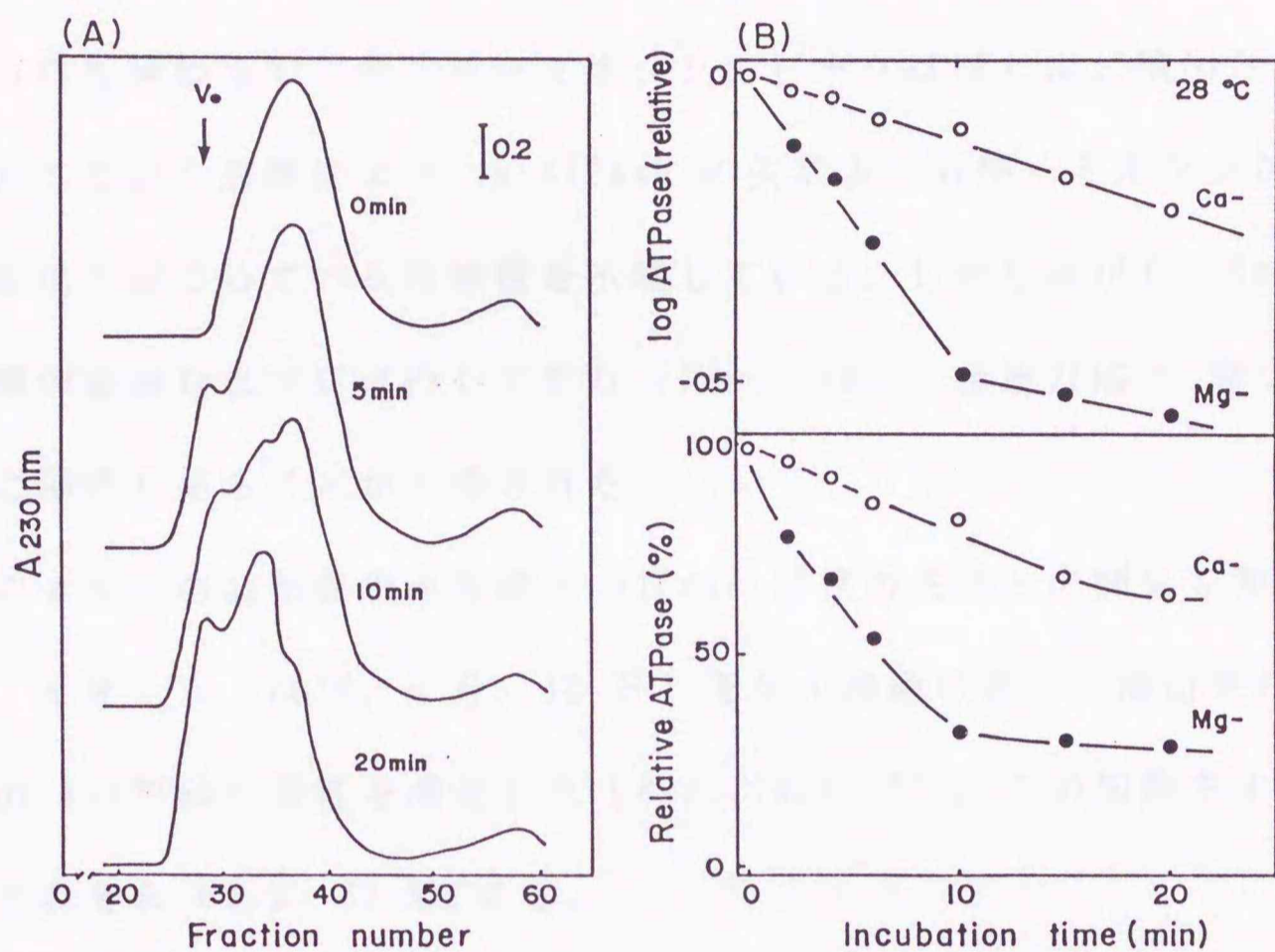


Fig. 77. Changes in the gel filtration profile and ATPase activity by thermal-treated of carp myosin.

Carp myosin in 0.5 M KCl - 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was heated at 28 °C for various periods. (A) Myosin was applied to the Sepharose CL-4B column (1.6 x 47 cm) equilibrated with 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). (B) Ca-ATPase activity (0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 5 mM  $\text{CaCl}_2$ ) (○), and actin-activated Mg-ATPase activity (0.028 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), and 1 mM  $\text{MgCl}_2$  in the presence of 0.046 mg/ml of rabbit F-actin) (●) were assayed at 25 °C.

また加熱に伴うCa-ATPase 活性、及びアクチン活性化 Mg-ATPase 活性の低下を Fig. 77 B に示したが、加熱によるオリゴマー生成と Ca-ATPase 活性の低下と比較してみると、活性が 90 % も残存している（5 分加熱）場合でも既にオリゴマーが検出された。また加熱時間 20 分の場合、Ca-ATPase 活性はまだ 60 % も残存しているにも関わらず、モノマーミオシンのピークはほとんど検出されなくなった。このことは、加熱により Ca-ATPase の失活よりも早くミオシンがオリゴマーとなる変化が起こっている可能性を示唆している。しかしながら、Mg-ATPase 活性の初期の急激な低下は進行しており（Fig. 77B）、凝集反応と Mg-ATPase 低下との間に関係があることが示唆された。

そこでミオシンの加熱凝集の生成と ATPase 活性の失活との関係を知るため、加熱コイ・ミオシン（30°C、5 分、10 分）をゲル濾過に供し、溶出される各フラクションの K-ATPase 活性を測定した（Fig. 78 A~C）。この加熱ミオシンの残存活性はそれぞれ 80 %、62 %である。

未加熱ミオシンの場合（Fig. 78 A）はモノマーミオシンとして溶出されたが、このピークに ATPase 活性が検出された。この実験では溶出時間を短縮するため Fig. 77 の場合よりも小型のカラムを用いたので第 2 のピークは検出されず、モノマーと  $V_0$  画分にしか分離できなかった。加熱時間が長いほど  $V_0$  に溶出されるオリゴマーのピークが次第に大きくなった。そしていずれの場合も  $V_0$  に溶出されたフラクションにも ATPase 活性が検出された。このことから、加熱によって生成したミオシンオリゴマーの中には ATPase 活性を保持しているミオシンが存在している事が明かとなった。そしてオリゴマーへの凝集反応は ATPase 活性を失ったミオシンにのみ起こる訳ではなく、ATPase 失活よりも先に起こることが示唆された。

しかし、各フラクションのタンパク質濃度と ATPase 活性から比活性を推定すると、 $V_0$  画分のミオシンの方がモノマーミオシンよりも活性値は低かったので、このミオシンオリゴマーの中には失活したミオシンも含まれると思われた。また、モノマーミオシンのピークの活性値を未加熱及び加熱した場合で比較すると、加熱ミオシンの方が明らかに低く、ATPase 活性を失っても凝集していないミオシンが存在している事が示唆された。これらの事より、凝集反応と ATPase 失活は独立して起こっていることが考えられた。

$30^{\circ}\text{C}$  の加熱によっても ATPase 活性を保持したままでミオシンはオリゴマーを形成することが示されたが、この凝集反応は低温でも進行した。調製後 3 日間程度氷蔵したコイ・ミオシンのゲル濾過溶出パターンを Fig. 78 D に示すが、モノマーより  $V_0$  のピークの方が大きくなっており、かなり凝集反応が進んでいた。また、この  $V_0$  に溶出された画分にも ATPase 活性が検出され、氷蔵していてもミオシンの凝集は起こり、その反応は ATPase 失活より早く進むことが示された。このためモノマーミオシンとして使用できるのは短期間であり、実験の遂行には頻繁に新鮮なミオシンを調製する必要があった。そのため、以下の実験では、小関ら (1991) が開発した筋原線維から直接ミオシンを調製する方法を採用した。この方法ではミオシンの調製に 3 時間程度 (透析を除く) しかかからなかった。そして調製したミオシンを使用するのは遅くとも翌日までとした。

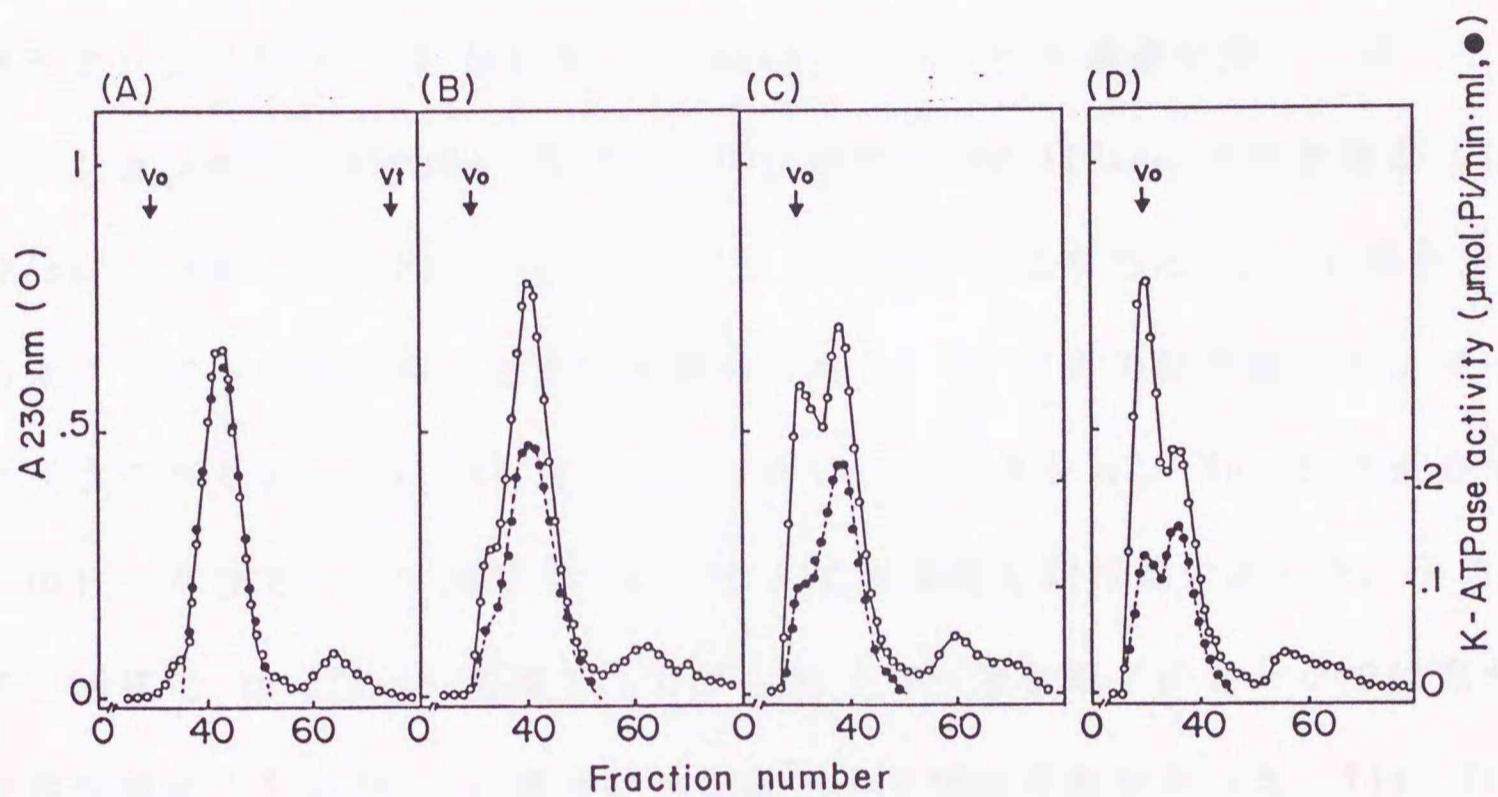


Fig. 78. ATPase activity of oligomeric form of carp myosin. Carp myosin was thermal-treated at 30 °C and applied on the Sepharose CL-4B column as in Fig. 77. The elution profile of protein (○) and K-EDTA-ATPase (K-ATPase) activity (●) of each fraction was shown. K-ATPase was measured in 0.5 M KCl, 5 mM EDTA, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 1 mM ATP. (A), control myosin; (B), myosin heated for 5 min.; (C), myosin heated for 10 min.; and (D), myosin stored on ice for 3 days.

(2) 加熱凝集によるミオシンの Ca-ATPase、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性  
の変化

加熱により ATPase 活性を有したままでもミオシンがオリゴマーとなることが判ったので、これらミオシンオリゴマーの Ca- 及び Mg-ATPase 活性について更に検討した。

加熱ミオシン (28°C、10 分) を Sepharose CL-4B ゲル濾過に供し、溶出した各フラクションの Ca-ATPase、及びアクチン活性化 Mg-ATPase 活性を測定した。Ca-ATPase については (Fig. 79 A) モノマーのピークはもちろん、 $V_0$  画分及び第 2 のオリゴマーの画分からも活性が検出された。 $V_0$  付近の活性値はモノマーのピーク (フラクション No 36) より低かったが、フラクション No 33 付近のオリゴマーのピークはモノマーのピークのそれとはほぼ同じ活性値であった。一方、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性について、モノマー及び第 2 のピークでは十分に高い活性が認められたが、 $V_0$  画分にはほとんど検出されなかった (Fig. 79 B)。

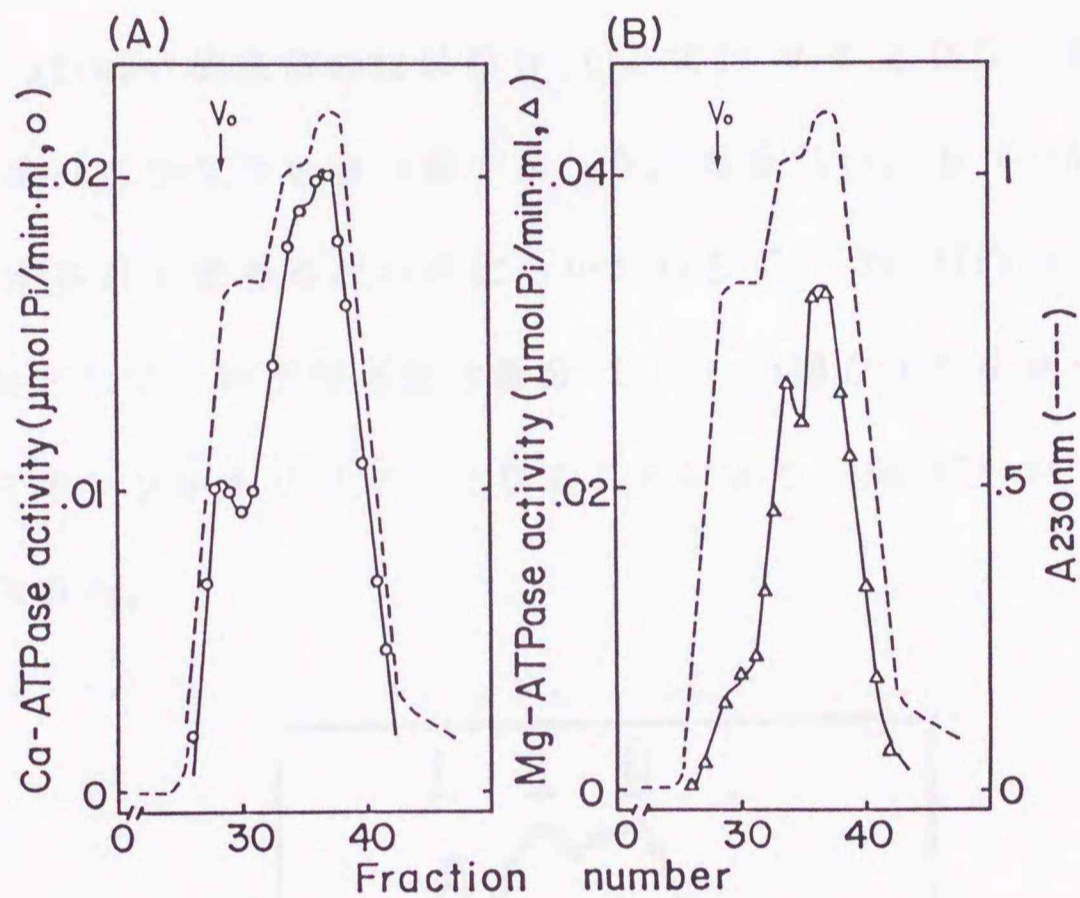


Fig. 79. Ca- and actin activated Mg-ATPase activities of carp oligomeric myosin separated on Sepharose CL-4B.

Carp myosin was thermal-treated at 28 °C for 10 min as in Fig. 77 and applied to Sepharose CL-4B. Ca-ATPase (A), and actin-activated Mg-ATPase (B) activities of the fractions were both assayed. The assay conditions for Ca-ATPase were as in Fig. 77. Mg-ATPase activity was measured in a medium of 0.053 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP and 0.057 mg/ml rabbit F-actin. Dashed line indicates elution profile of protein.

各フラクションの両 ATPase 活性の関係を知るため、Fig. 80 に示すように  $V_0$  画分 (i)、第2のピークとして溶出されるオリゴマー画分 (ii)、そしてモノマー画分 (iii) のそれぞれについて検討した。それぞれの画分の Ca-ATPase 及び Mg-ATPase 比活性を測定し、Table 8 に示した。画分 (i) は画分 (iii) のモノマーミオシンと比べると Ca-ATPase で約 50 % となり、Mg-ATPase では 15 % 程度の活性値しか示さず、Mg-ATPase の低下の方が著しかった。Ca-ATPase 活性値に対する Mg-ATPase 活性値の比は画分 (i) では 0.8 となり、画分 (iii) での値 (2.5) に比べてかなり小さい値であった。画分 (ii) の Ca-ATPase 活性値は画分 (iii) のそれと変わらないのにもかかわらず、Mg-ATPase 活性は 80 % に低下し、結果として、両活性の比は画分 (iii) の場合より小さくなった。これらの事より、ミオシンがオリゴマーとなることにより、Mg-ATPase 活性の低下が起こると考えられた。

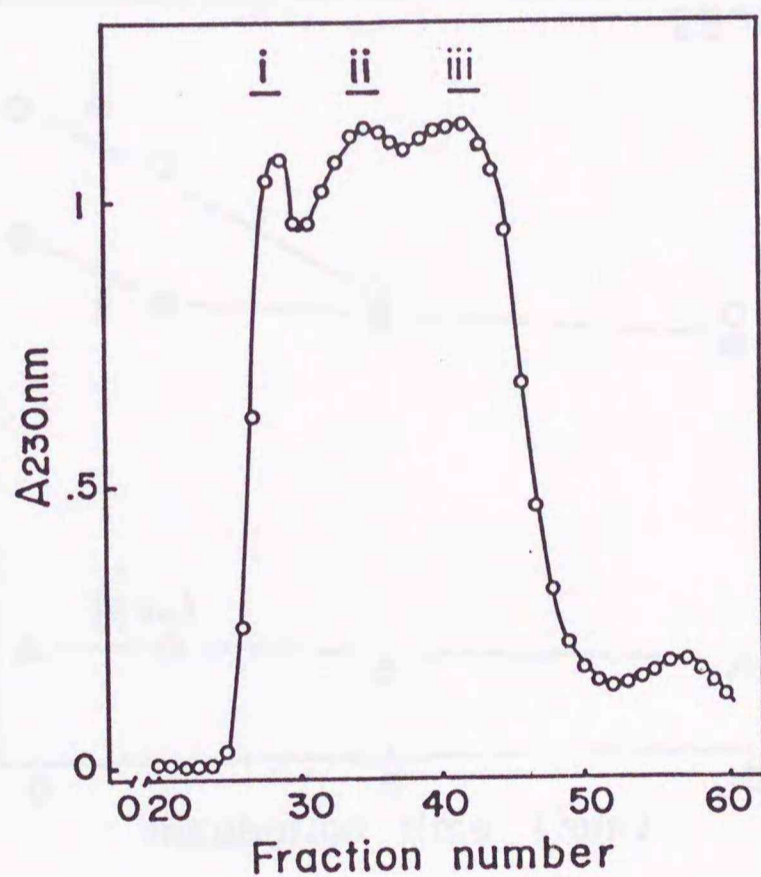


Fig. 80. Fractionation of thermally treated myosin by Sepharose CL-4B gel filtration.

Carp myosin thermal-treated at 28 °C for 10 min was applied to Sepharose CL-4B column (1.6 X 47 cm). The eluted proteins were separated into three fractions; (i), (ii) and (iii) as indicated by bars.

Table 8. Ca-ATPase and actin-activated Mg-ATPase activity of the three fractions separated by Sepharose Cl-4B gel filtration.

	ATPase activity ( $\mu\text{mol Pi}/\text{min}\cdot\text{mg}$ )		
	Ca-	Mg-	Mg/Ca
i ( $v_0$ )	0.07	0.06	0.8
ii	0.14	0.29	2.0
iii	0.14	0.36	2.5

Fractions (i), (ii) and (iii) are the same as in Fig. 80. Ca-ATPase and Mg-ATPase were assayed under the same conditions as in Fig. 77. The activity ratio of Mg-ATPase to Ca-ATPase was indicated as Mg/Ca.

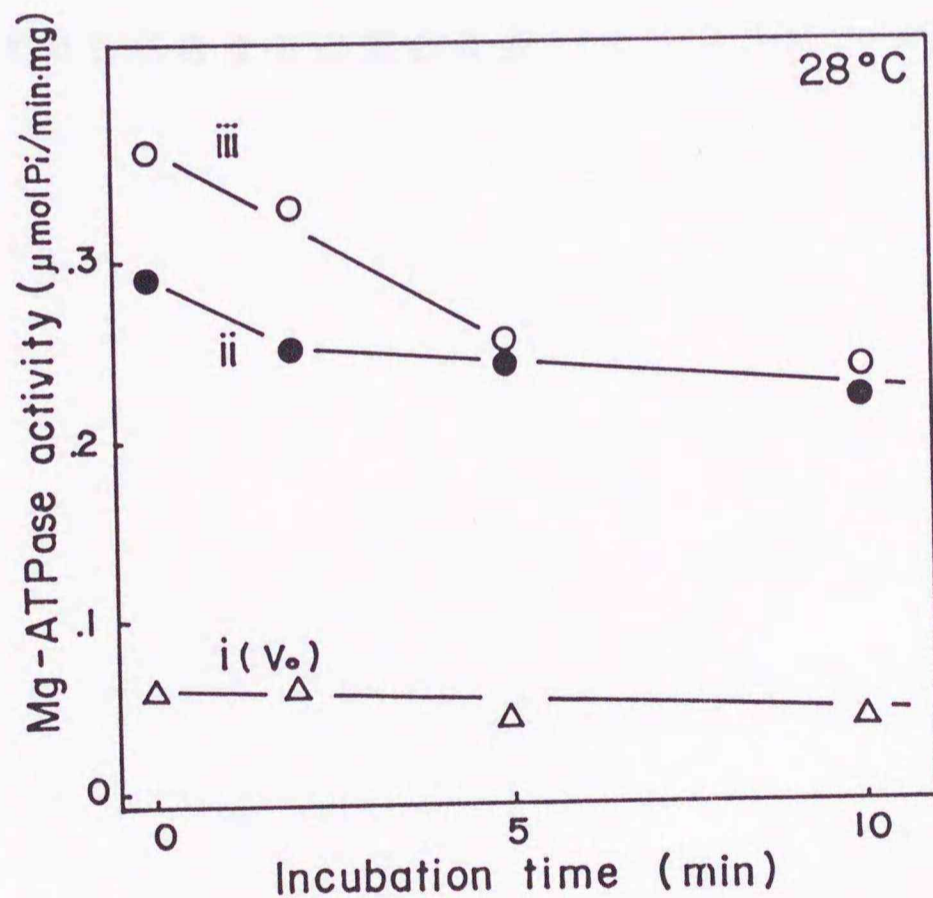


Fig. 81. Thermal inactivation profile of Mg-ATPase activity for the fractions separated by Sepharose CL-4B gel filtration.

Fractions (i), (ii) and (iii) as in Fig. 80 were thermal-treated at 28 °C and actin activated Mg-ATPase activity decreases were compared among three fractions. Fraction (i)( $\Delta$ ), fraction (ii)( $\bullet$ ) and fraction (iii) ( $\circ$ ).

Kimuraら (1983)、田中ら (1982) はミオシンの加熱変性初期には Ca-ATPase の失活よりも先にミオシンフィラメント形成能に変化が起き、これが原因となってアクチンとの相互作用が低下し、アクチン活性化 Mg-ATPase 活性が低下すると報告している。この事実は本論文中でも Fig. 77 において確かめられた。そこで画分 (i)、(ii)、及び (iii) をさらに 28°C で加熱し、それらの Mg-ATPase の失活様式を調べた (Fig. 81)。Fig. 77 の結果から、分画前の加熱処理 (28 °C 10 分) ミオシンはもはやアクチン活性化 Mg-ATPase 活性の初期の急激な変化は終了していると予想される。この加熱処理ミオシンから分離したモノマー画分 (iii) では再び加熱初期の急速な活性低下が検出され、2段階の失活様式を示した。それに対し、画分 (ii) では2段階の失活反応が見えるもののその程度は小さく、また画分 (iii) では活性が低いまま、後期の緩やかな反応しか認められなかった。

これらの結果から、ミオシンのオリゴマー形成がアクチン活性化 Mg-ATPase 活性の速い失活の原因であるように思われた。

### (3) 加熱凝集によるミオシンのフィラメント形成能の変化

前述の結果から、ミオシンのオリゴマー形成が Mg-ATPase 活性低下の原因であることが示唆された。田中ら (1992) によると ミオシンの加熱初期において、Mg-ATPase の初期の急速な低下と対応するように、ミオシンのフィラメント形成能が変化することを濁度変化や電子顕微鏡観察から示している。そこで分画したオリゴマー画分のフィラメント形成能を検討した。

まず、分離した画分 (i)、(ii)、(iii) のミオシンの 0.1 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 条件下で形成する集合体を電子顕微鏡で観察した (Fig. 82)。画分 (iii) は典型的なミオシンフィラメント (Huxley, 1963) を形成しており、フィラメント中央にベアーズーンも認められる、正常なフィラメントであることが確かめられた。画分 (ii) の場合も同様のフィラメントが観察されたが、その他に、丸い凝集体や、非常に細いフィラメントが集合したような巨大な凝集体も観察された。また画分 (i) の場合はもはや正常なフィラメントは検出されず、巨大な凝集体しか認められなかった。

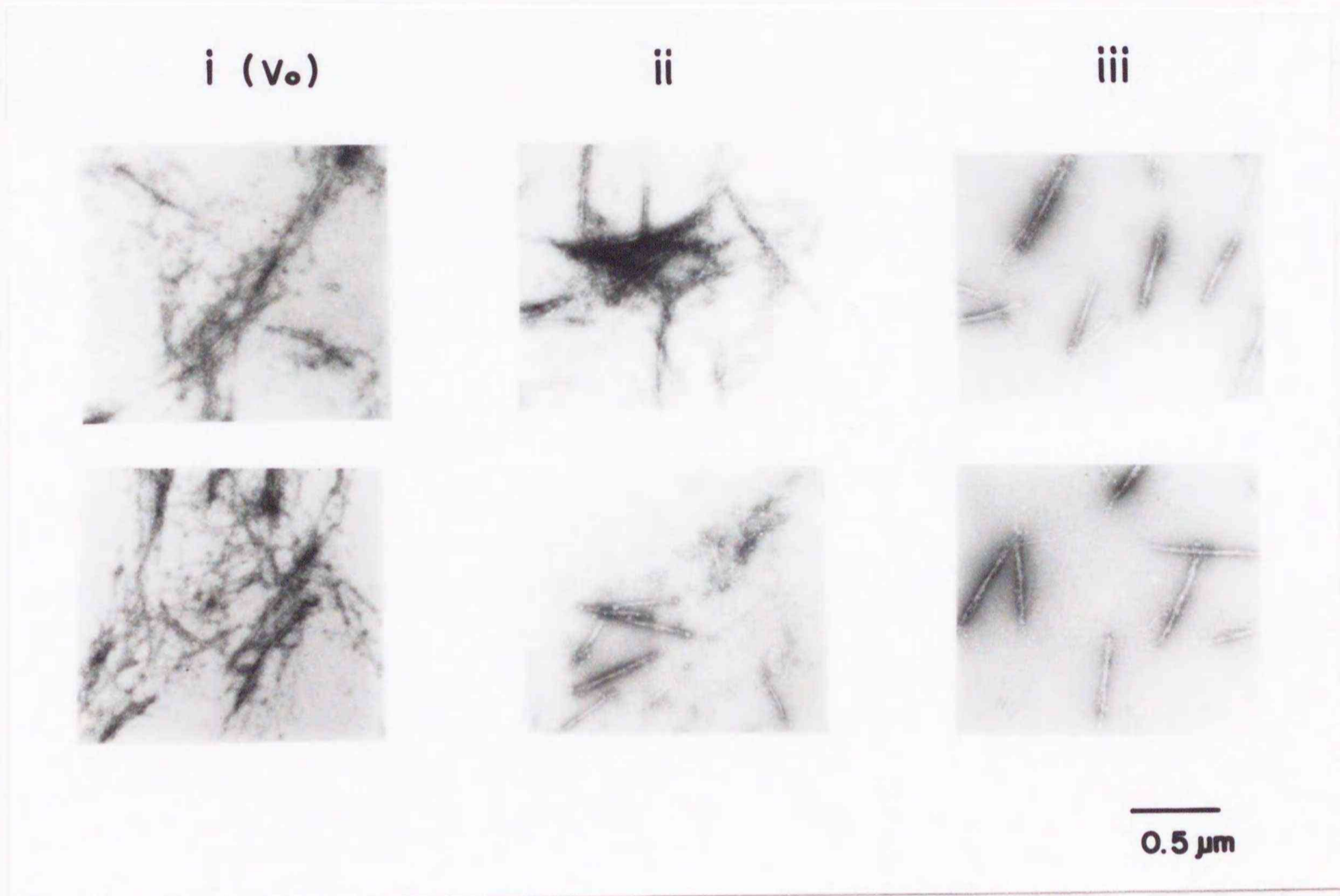


Fig. 82. Electron micrographs of myosin filaments of three fractions separated on Sepharose CL-4B.

Fractions (i), (ii) and (iii) as in Fig. 80 were used. The filaments were allowed to form by diluting KCl concentration to 0.1 M. Electron micrograph was taken as in Fig. 32.

また、これらの画分中のミオシンのフィラメントあるいは凝集体形成に対する  $Mg^{2+}$  要求性を調べたところ (Fig. 83)、画分 (iii) は正常な  $Mg^{2+}$  要求性を示すのに対し、凝集体を形成しているオリゴマー画分、特に画分 (i) は  $Mg^{2+}$  の影響を受けず、また高濃度の  $Mg^{2+}$  による解集合も起こらなくなった。このことから正常なミオシンフィラメントでない事が示唆された。

以上のことより、ミオシンがオリゴマーとなるとフィラメント形成能が変化し、特に Sepharose CL-4B ゲル濾過で  $V_0$  に溶出されるほどのサイズのオリゴマーとなると、低イオン強度下でもはや正常なフィラメントを形成できず、凝集物となることを確認した。また、加熱初期にミオシンのフィラメント形成能が変化するのは、加熱により形成するミオシンオリゴマーのフィラメント形成能が正常ではないためであると結論した。

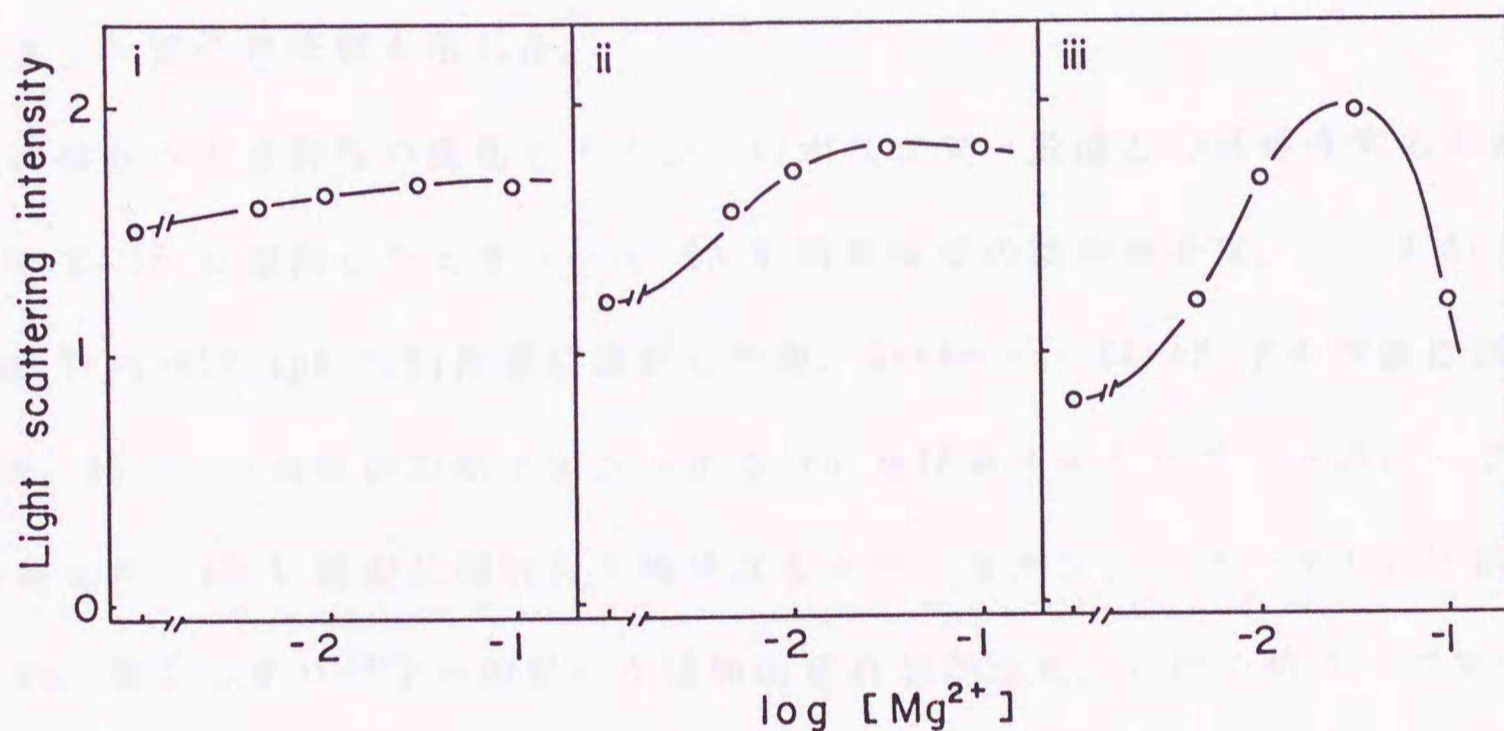


Fig. 83. Mg-requirements for the filament formation of three fractions of myosin separated on Sepharose CL-4B.

The same three fractions as in Fig. 80 were used. Myosin solution was diluted with 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) to give a final KCl concentration of 0.075 M. Turbidity of the myosin suspension was monitored by measuring a light scattering intensity at 350 nm in the presence of various  $Mg^{2+}$  concentrations.

#### (4) 加熱凝集によるミオシンの硫安に対する溶解性の変化

加熱によりミオシンがオリゴマーとなる事は Sepharose CL-4B ゲル濾過によって確認したが、他の方法でもオリゴマーの分離を検討した。ミオシンの調製法のひとつに硫安分画法があるが、ミオシンが沈澱する硫安濃度は飽和度 40~55 % の範囲である。そこで飽和硫安による加熱処理ミオシンの分画を試みた。

ミオシン (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 28°C で種々の時間加熱した後、40 % 飽和となるように飽和硫安を加え、遠心分離 (20,000 x g、15 分) し、上澄のミオシン濃度を測定した (Fig. 84)。未加熱ミオシンでは 40 % 飽和硫安を加えてもほとんど沈澱せず、上澄に回収されたが、加熱時間が長くなるにつれて 40 % 飽和硫安で沈澱する画分が多くなった。さらに 20 分間加熱したミオシンの場合、Ca-ATPase 活性が 65 % 程度も残存しているにもかかわらず、溶解ミオシン量は最低値を示した。

この硫安への溶解性の変化とミオシンのオリゴマー形成との関係を知るため、28 °C で 15 分加熱したミオシンの 40 % 飽和硫安の溶解画分を、0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 溶液に透析した後、Sepharose CL-4B ゲル濾過に供した (Fig. 85)。分画前の加熱ミオシンから  $V_0$  及び第 2 のオリゴマーのピークが検出されたが、40 % 硫安に溶解した画分はモノマーミオシンのピークとして溶出され、 $V_0$ 、第 2 のオリゴマーのピークは検出されなかった。このためオリゴマーミオシンは 40 % 硫安で全て沈澱してしまった事が明かとなった。

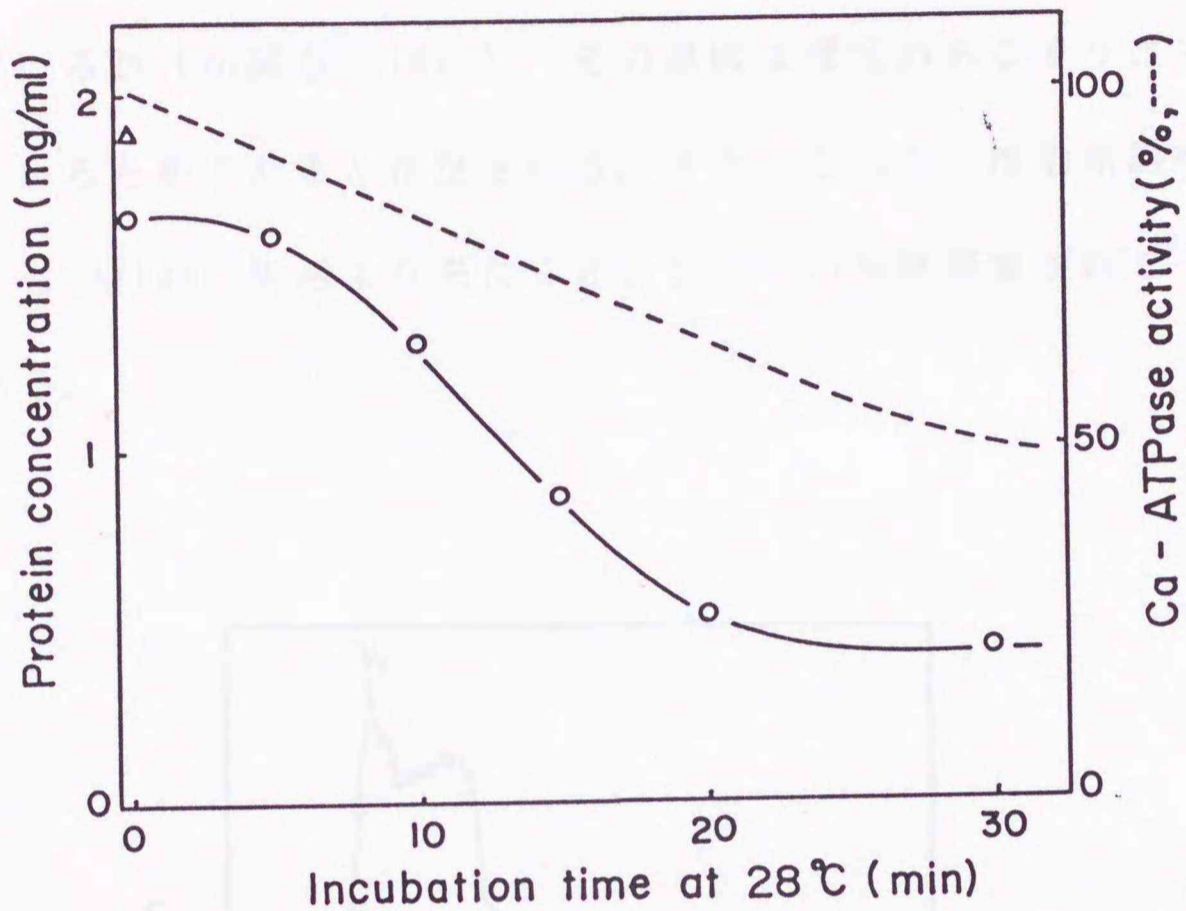


Fig. 84. Ammonium sulfate fractionation of thermally treated carp myosin.

To the carp myosin incubated at 28 °C, saturated  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  solution was added to give 40 % saturation, and centrifuged at 20,000 x g for 15 min. The concentration of protein recovered in the supernatant was measured (O). Ca-ATPase inactivation induced by the incubation was indicated by the dashed line. (Δ), protein concentration of control myosin solution.

これらの結果は、オリゴマーミオシンはモノマーミオシンとは異なり、40%飽和硫酸で沈澱する事を示している。言い替えると、硫酸分画(40~55%飽和硫酸)法で調製したミオシンにはミオシン凝集体は含まれない事が示された。先に、加熱した筋原線維からのミオシン収量の低下がCa-ATPaseの失活より速く起こる事が報告されているが(小関ら、1991)、その原因は活性のあるオリゴマーミオシンが除かれているためであると推定される。また、このことは筋原線維中のミオシンにおいてもATPase失活より先にミオシン分子の加熱凝集が起こっている事を示唆している。

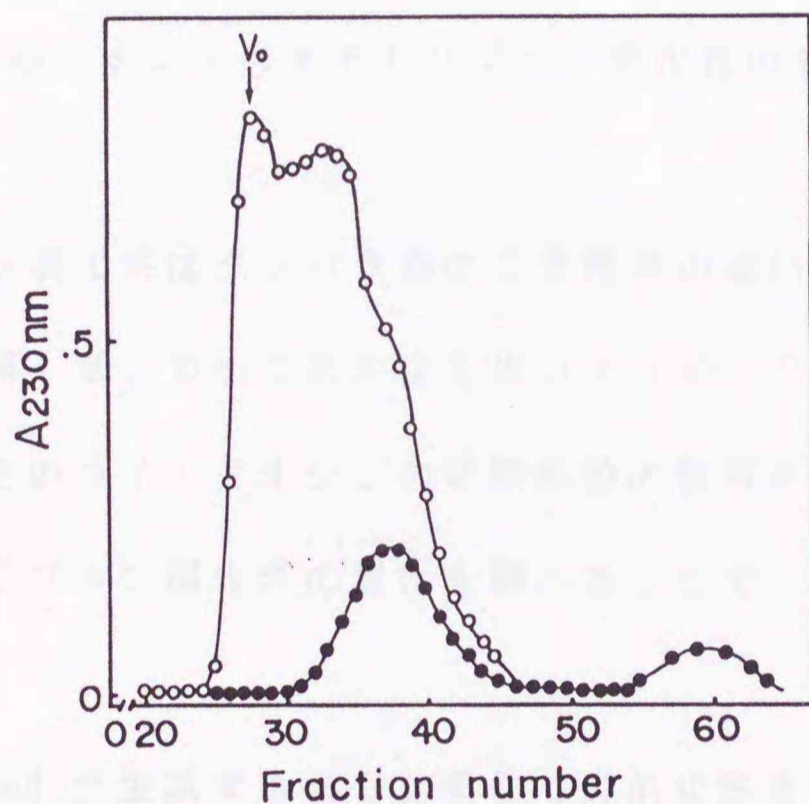


Fig. 85. Sepharose CL-4B gel filtration profile of the thermal-treated myosin fractions by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Thermal-treated myosin obtained at 28 °C for 15 min (○) and its supernatant fraction at 40%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  saturation (●) were applied to the Sepharose CL-4B gel column.

## 2. 加熱凝集ミオシンの凝集部位の推定

加熱によるミオシンのオリゴマーへの凝集反応は ATPase 失活よりもかなり速い反応であり、また ATPase 失活とは独立して起こることを明らかにした。これはミオシンが S-1 以外の部分でも凝集している可能性を示唆している。また、オリゴマーミオシンは正常なフィラメント形成能を失っていることから、構造変化しているのはフィラメント形成に関わる rod 部分ではないかと考えられた。ここではミオシン分子の、凝集反応に関与している部位を明らかにする事を目的とした。

### (1) 加熱によるミオシンのキモトリプシン消化性の変化

キモトリプシン消化性はタンパク質の立体構造の違いの検出に有効な手法であり、本論文中（第1章）でもこの方法を用いてコイ・ミオシン分子の構造特性を明らかにした。そのコイ・ミオシンの切断部位の情報を参考にし、加熱によるミオシンのキモトリプシン消化性の変化を調べることで、構造変化を起こす部位を探ろうとした。

まず S-1 と rod が生成するような条件での消化性を検討した。コイ・ミオシン (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 30°C で 0~30 分加熱後、0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM EDTA の条件下でキモトリプシン消化 (1/250 (w/w)、20°C、30 分) した。加熱による消化生成物の変化を SDS-PAGE により検討した (Fig. 86)。

既に第1章で述べたように、未加熱ミオシンからは rod と S-1 が生成していた。加熱処理したミオシンの場合はこれまでの報告の通り、変性した S-1 部分がキモトリプシンによって小断片化し、S-1 生成量は減少していった（今野ら、1990）。一方、rod よりも 10 kDa 程度サイズの大きいバンドが新たに生成するようになった。この加熱ミオシンの消化物を低イオン強度溶液（0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)）下で超遠心分離したところ、この新たな成分は沈澱画分に回収された。また、図示しないが高イオン強度溶液（0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)）中で超遠心分離すると、この成分は沈澱しないので、rod 同様に塩溶性の性質を有する事が確かめられた。この生成物は rod と類似した性質の断片であったので、rod 様フラグメント (rod') と呼ぶ事にした。



Incubation time (min) at 30°C

Fig. 86. Change in the chymotryptic digestibility of carp myosin by thermal treatment.

Carp myosin in 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was thermal-treated at 30 °C and then digested for 30 min at 20 °C in a medium of 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 1 mM EDTA by using 1/250 (w/w) chymotrypsin. HC, rod, rod' and S-1 are myosin heavy chain, rod, rod-like fragment and S-1 heavy chain, respectively. S and P denote supernatant and pellet fractions obtained by centrifugation at 80,000 x g for 60 min, respectively. M, native myosin.

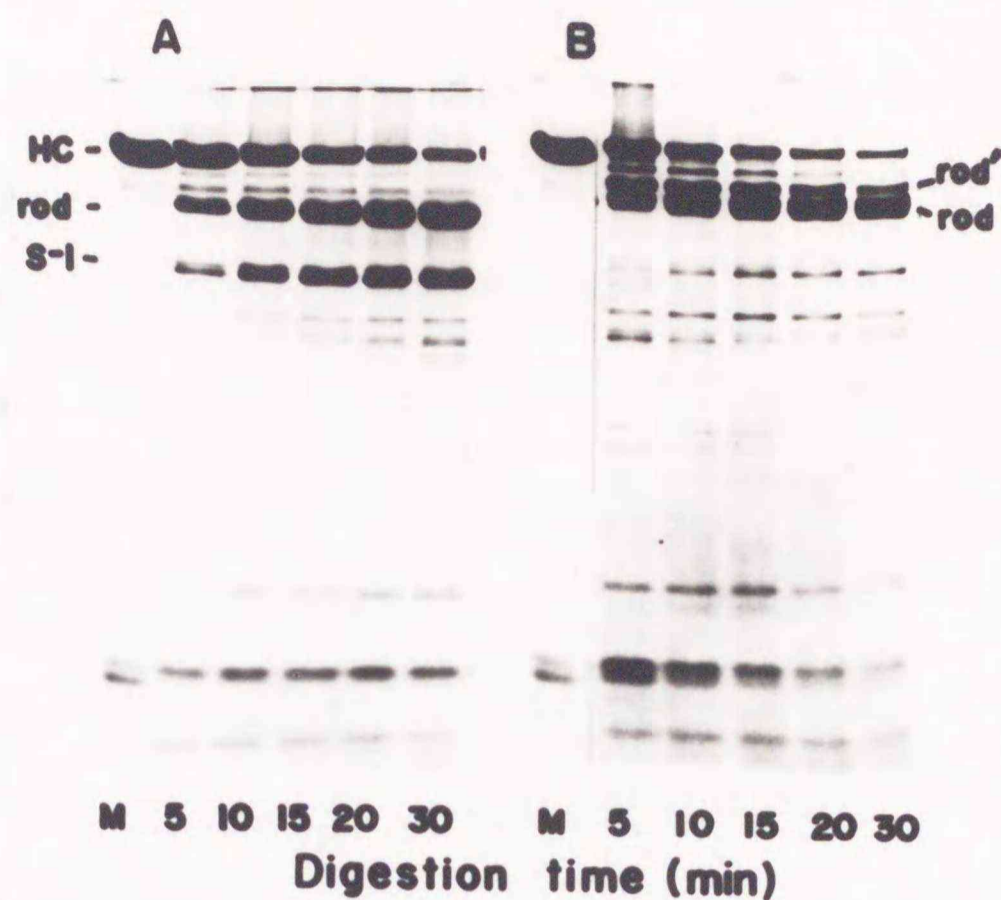


Fig. 87. Chymotryptic digestion profile of thermal-treated myosin.

Unheated (A) and heated carp myosin for 30 min at 30 °C (B) were digested under the same conditions as in Fig. 86 except the digestion time. The abbreviations used for protein bands are as in Fig. 86.

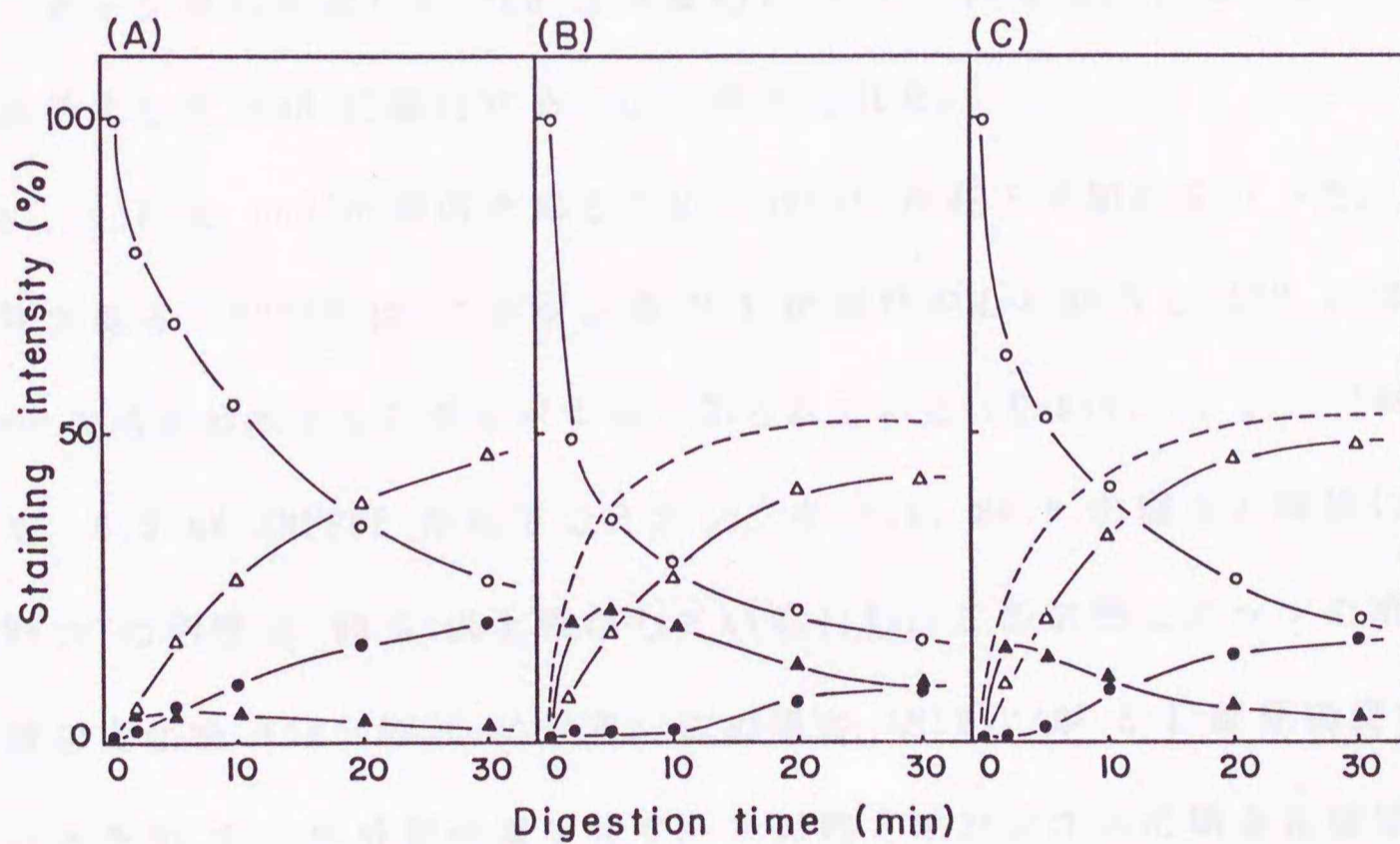


Fig. 88. Production of rod and rod-like fragment by chymotryptic digestion of heated myosin.

Unheated myosin (A), heated myosin (B) and heated myosin in the presence of 1 mM MgCl<sub>2</sub> and 0.3 mM AMPPNP (C) were used. Myosin was heated at 30 °C for 30 min. The disappearance of myosin heavy chain (O), and production of rod (Δ), rod-like fragment (▲) and S-1 (●) were densitometrically estimated from the SDS-PAGE.

Sum of rod and rod' was expressed by the dashed lines.

この rod' の生成過程を見るため、未加熱及び加熱ミオシンのキモトリプシン消化の時間経過を調べた (Fig. 87 A, B) ところ、加熱ミオシンからは消化の初期 (5~10 分) にかなり大量の rod' が生成していることが判った。更に消化を続けると rod' 量は減少して rod に移行しているように見えた。この SDS-PAGE 上の rod、rod'、及び S-1 生成量を定量し、その変化を Fig. 88 に示した。それによると、まず未加熱ミオシンからは (Fig. 88 A) rod' はほとんど生成しないのに対し、加熱ミオシン (Fig. 88 B) からの rod' 生成量は消化初期に最大値を示した後減少していった。また rod と rod' の生成量の和を Fig. 88 B 中に点線で示したが、HC が同程度消化された場合の rod 及び rod' の総生成量を未加熱ミオシンからの rod 生成量 (Fig. 88 A) と比較すると、HC が 50 % 消失したときは、未変性ミオシンからの rod 量も加熱ミオシンからの rod と rod' の総量も共に約 30 % であり、また HC 70 % 消失時ではいずれも 45 % であった。このため、加熱ミオシンから生成した rod' は本質的に rod と同じで、消化が進行していくと低分子化して rod に移行するものと考えられた。

次に、rod と rod' の関係を知るため AMPPNP 存在下で加熱を行った。ATP 類似化合物である AMPPNP は ミオシンや S-1 の活性中心に結合し ATP と同じ様に ATPase 失活を抑制する効果を示す事で知られている (Hamai, *et al.*, 1991)。そこで、0.3 mM AMPPNP 存在下でミオシンを Fig. 88 B の場合と同様に加熱処理 (ATPase の活性は 95 % 以上残存している) し、この加熱ミオシンの消化物の各成分量の変化を Fig. 88 C に示す。この場合 AMPPNP が S-1 部分の変性を抑制しているため S-1 生成量は減少せず、未加熱ミオシンからの場合とほぼ同量の S-1 が生成していた。しかし、この場合でも rod' の生成は認められた。すなわち、S-1 生成量が減少しなくても rod' の生成が起こっていることが示された。rod' は

rod よりも 10 kDa 程長い断片であるが、もし S-1 側に長いのであれば、rod' 生成量の分だけ S-1 量が減少するはずである。しかし、S-1 量と rod' 生成量の間に関係は見られないので、rod' は rod が S-1 側ではなく反対方向の C 末端側に長いものと考えた。ウサギ・ミオシンの場合はミオシン C 末端部分が選択的にプロテアーゼで切断され、rod はこの部分を欠損していることを先に述べたが (Walker, *et al.*, 1985; Maita, *et al.*, 1991)、この部分はミオシンがフィラメントを形成していても切断を受ける。しかし、加熱によって凝集したミオシンは低イオン強度溶液下で正常なフィラメントではなく、不規則な凝集体を作るために、C 末端部分が凝集体内部に埋もれ、キモトリプシンで切断され難くなったのではないかと考えられた。消化が進むと切断される事からも、この部分の切断抑制は物理的障害によるものである事を推測させる。このため、rod' の生成は加熱によりオリゴマーとなったミオシンが低イオン強度下で凝集物となっている事を反映していると思われた。なお、AMPPNP 存在下で加熱したときの rod' 量は非存在下で加熱した場合の 70 % 程度であり、AMPPNP は rod' 生成も少し抑制していた。

rod' は消化を受けて rod へと移行するので、消化の条件が変わると見かけの rod' 生成量はかなり異なる。そこで 30°C で加熱したミオシンを Fig. 88 と同条件で 5 分、10 分、30 分間消化し、加熱による S-1 及び rod' の生成量変化を各消化時間毎に比較した (Fig. 89)。消化時間が 5 分の場合 (Fig. 89 A) は rod' 生成量は加熱時間に比例するように増加した。しかし、消化時間が長い場合、見かけの rod' 生成量は次第に少なくなり、消化時間を 30 分とした場合 (Fig. 89 C) では加熱初期では見かけ上 rod' は生成していないように見える。このように rod' 生成量は加熱に伴い増加するものの、rod への移行も同時に起こるので、

その生成速度は求められず、rod'の生成で変性の有無は判るが、変性の速度を比較するのは困難であった。

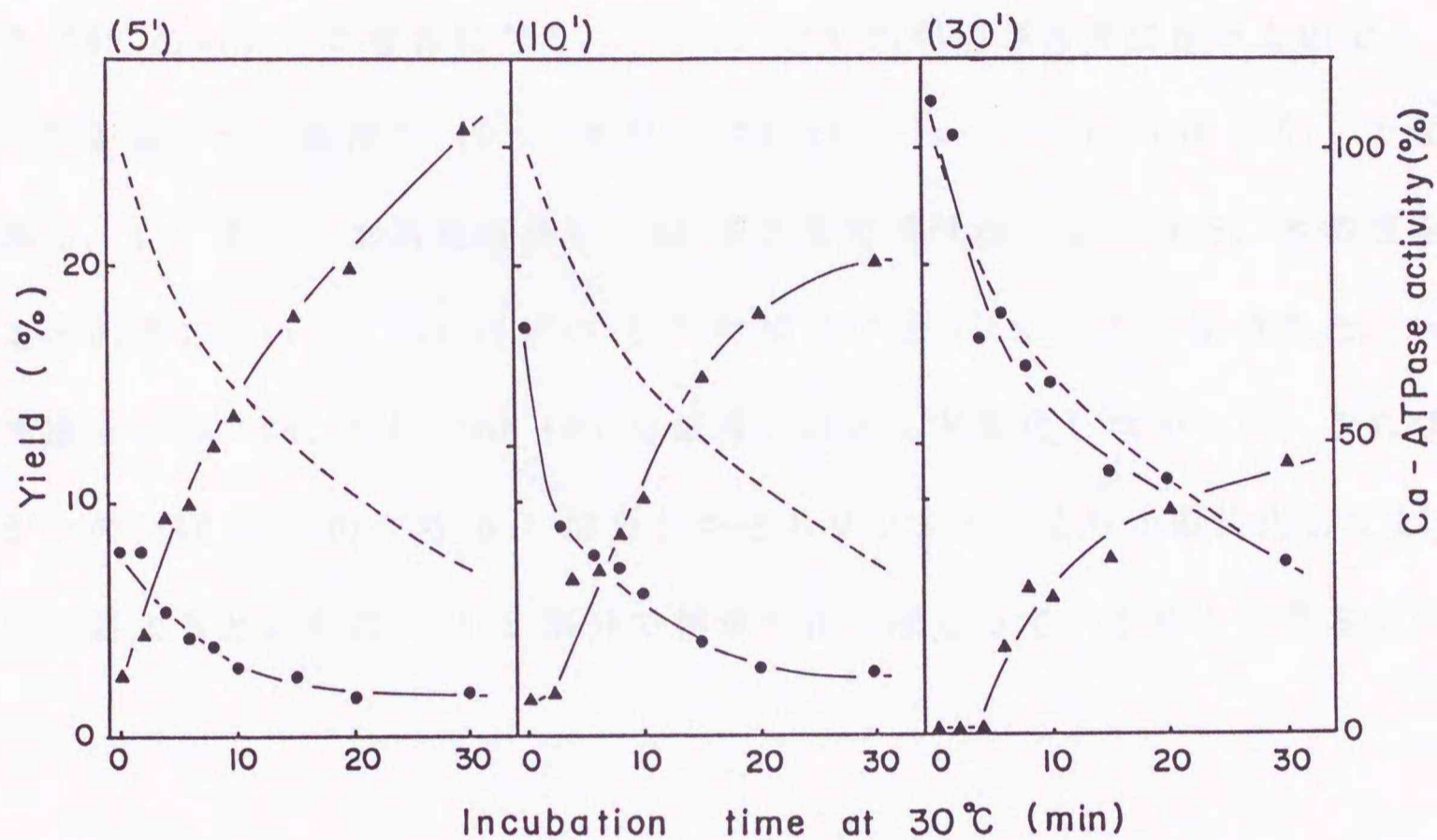


Fig. 89. Production of rod-like fragment (rod') by chymotryptic digestion of heated myosin.

Thermally treated myosins at 30 °C were digested under the same conditions as in Fig. 86 except that the digestion was performed for 5 min (5'), 10 min (10') and 30 min (30'). The amounts of rod' (▲) and S-1 (●) were densitometrically estimated as in Fig. 88. Change in Ca-ATPase activity was shown by the dashed line.

以上のように、加熱ミオシンのフィラメント形成能が変化している事をキモトリプシン消化によっても示す事ができたが、次に rod 内部での変化を検出しようとした。加熱による rod 内部の消化性の変化を検討するため、加熱ミオシンを 0.5 M KCl、1 mM EDTA 存在下で HC が消失するまで消化し、消化生成物の変化について調べた (Fig. 90)。加熱時間が長くなるにつれて 60~70 kDa 付近の S-2 や LMM のバンドが複雑になり、S-2 と LMM の判別が困難になったので、この消化物を低イオン強度下 [0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)] で超遠心分離し、S-2 を含む水溶性画分と LMM を含む塩溶性画分に分けた。水溶性画分を見ると加熱に伴い 60 kDa 付近の S-2 生成量が減っている事が示された。一方、塩溶性画分中の 70k、62k、40k LMM 生成量はほとんど変化しなかった。これは、ミオシンの rod 部分のうち S-2 部分がキモトリプシンにより小断片化してしまったことによると思われる、S-2 部分で構造変化が起こっている事を予想させた。

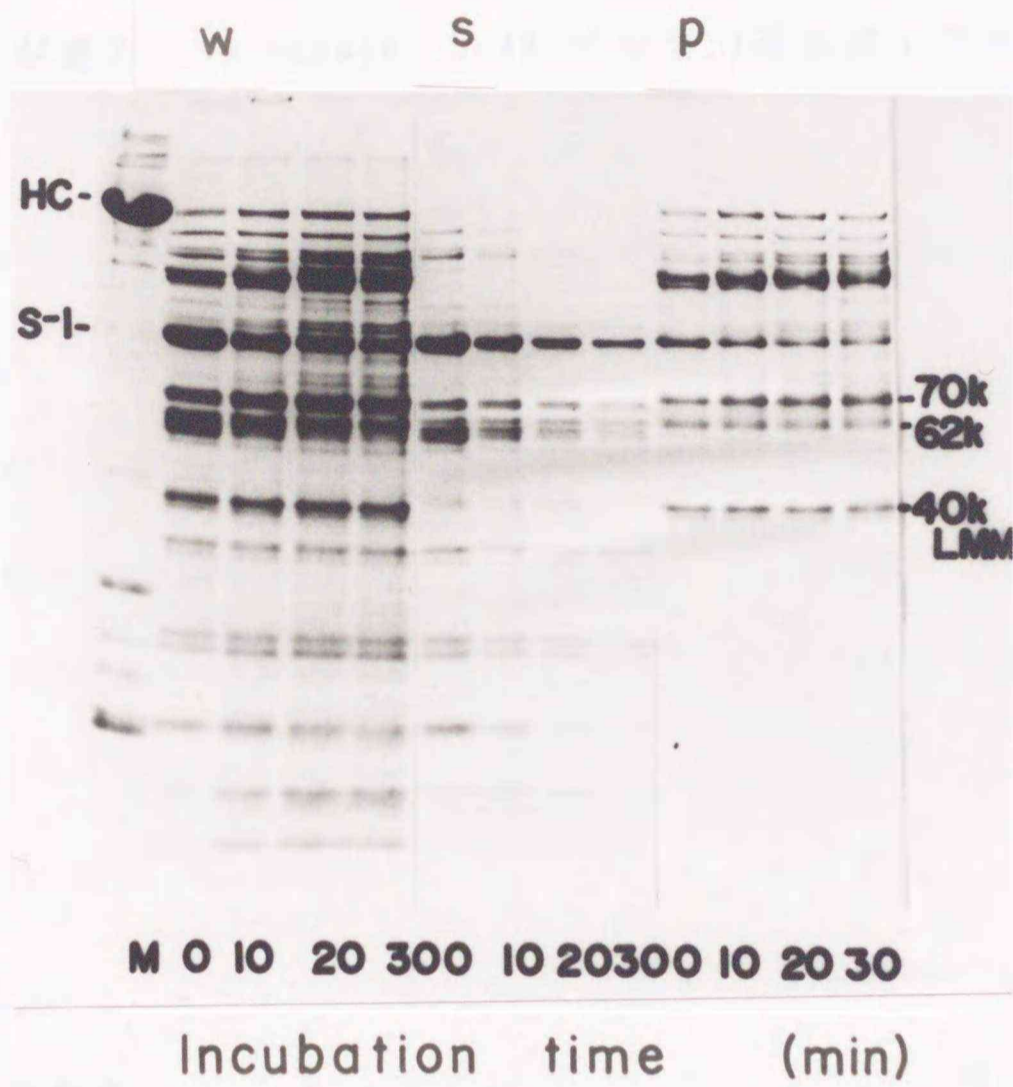


Fig. 90. Effect of thermal-treatment of carp myosin on the chymotryptic digestibility.

Carp myosin was heated at 30 °C and digested by chymotrypsin in a medium of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM EDTA. The digests were dialyzed against 0.05 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0), and centrifuged at 80,000 x g for 60 min. (w), (s) and (p) indicate the whole digest, supernatant and pellets, respectively.

(2) 加熱ミオシンのキモトリプシン消化物の Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出

図

(1)で示した加熱ミオシンのキモトリプシン消化物をゲル濾過で分析することにより、消化物の凝集状態を探ろうとした。まず、ミオシンを 30 °C、10 分加熱すると凝集反応が進み、Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図上で単量体のピークより  $V_0$  のピークの方が大きくなっていた (Fig. 91 A)。このミオシンの 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM EDTA 中での消化物を 0.5 M KCl 溶液で溶解し、超遠心分離して上澄を Sepharose CL-4B ゲル濾過に供した (Fig. 91 B)。未加熱ミオシン消化物の場合は フラクシオン No 17 及び 25 にそれぞれ rod と S-1 のピークが検出された。 $V_t$  (No 31) の大きなピークは消化反応溶液中に含まれていたマレイン酸由来の吸収である。一方、加熱ミオシンの消化物の溶出図形は、S-1 生成量が減少しているため S-1 のピークが小さくなったが、ほかに No 17 の rod のピークも小さくなっていた。それに代わって  $V_0$  に大きなピークが現れたので、このピーク中に溶出された成分を SDS-PAGE で調べた結果、少量の rod' とかなりの量の rod が含まれていた。このため消化物中の rod の大部分はオリゴマーとして存在していることが確かめられた。

図示しないが、長時間加熱したミオシンの消化物では  $V_0$  のピークは更に大きくなり、生成した rod' の全てと rod は  $V_0$  に溶出されていた。このようにオリゴマーミオシンを S-1/rod junction で切断しても、まだ rod や rod' が凝集しているので、ミオシンの凝集は少なくとも rod の部分で起こっているという先の推定を支持した。

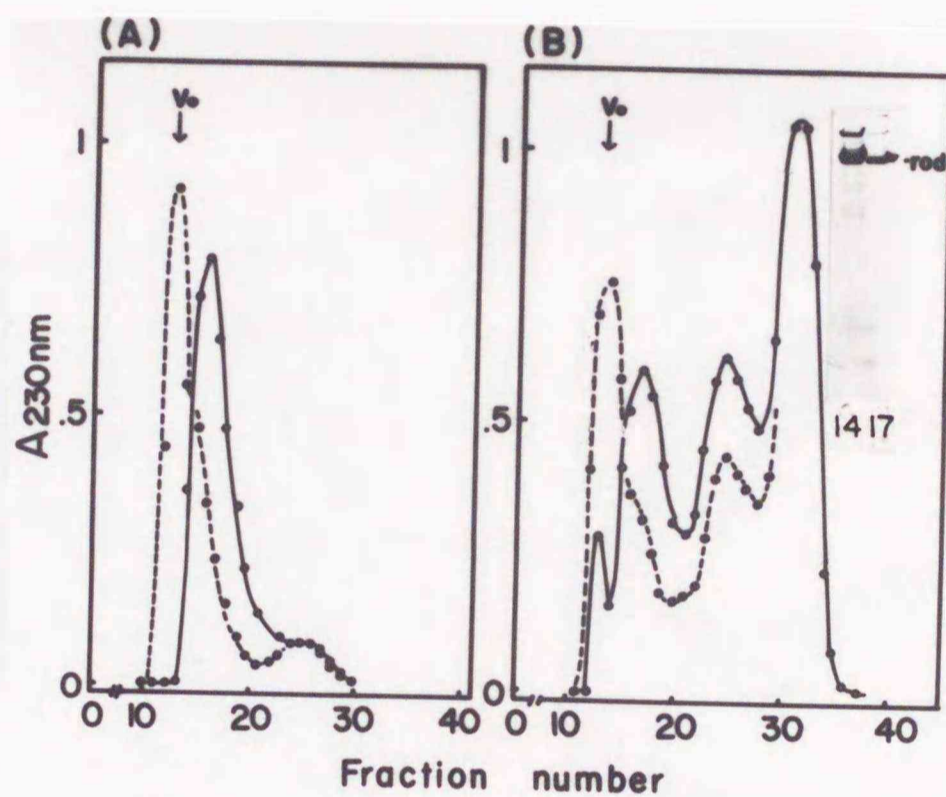


Fig. 91. Sepharose CL-4B gel filtration profile of thermal-treated myosin and its chymotryptic digest.

(A), Unheated (○) and heated myosin at 30 °C for 10 min (●) were directly applied to the Sepharose CL-4B gel column equilibrated with 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5). (B), The same myosins were also applied to the column after chymotryptic digestion for 30 min at 20 °C in a medium of 0.05 M KCl, pH 7.0 and 1 mM EDTA using 1/250 (w/w) chymotrypsin. The inset figures show the SDS-PAGE patterns of the fractions 14 (V<sub>0</sub>) and 17 of the heated myosin digest.

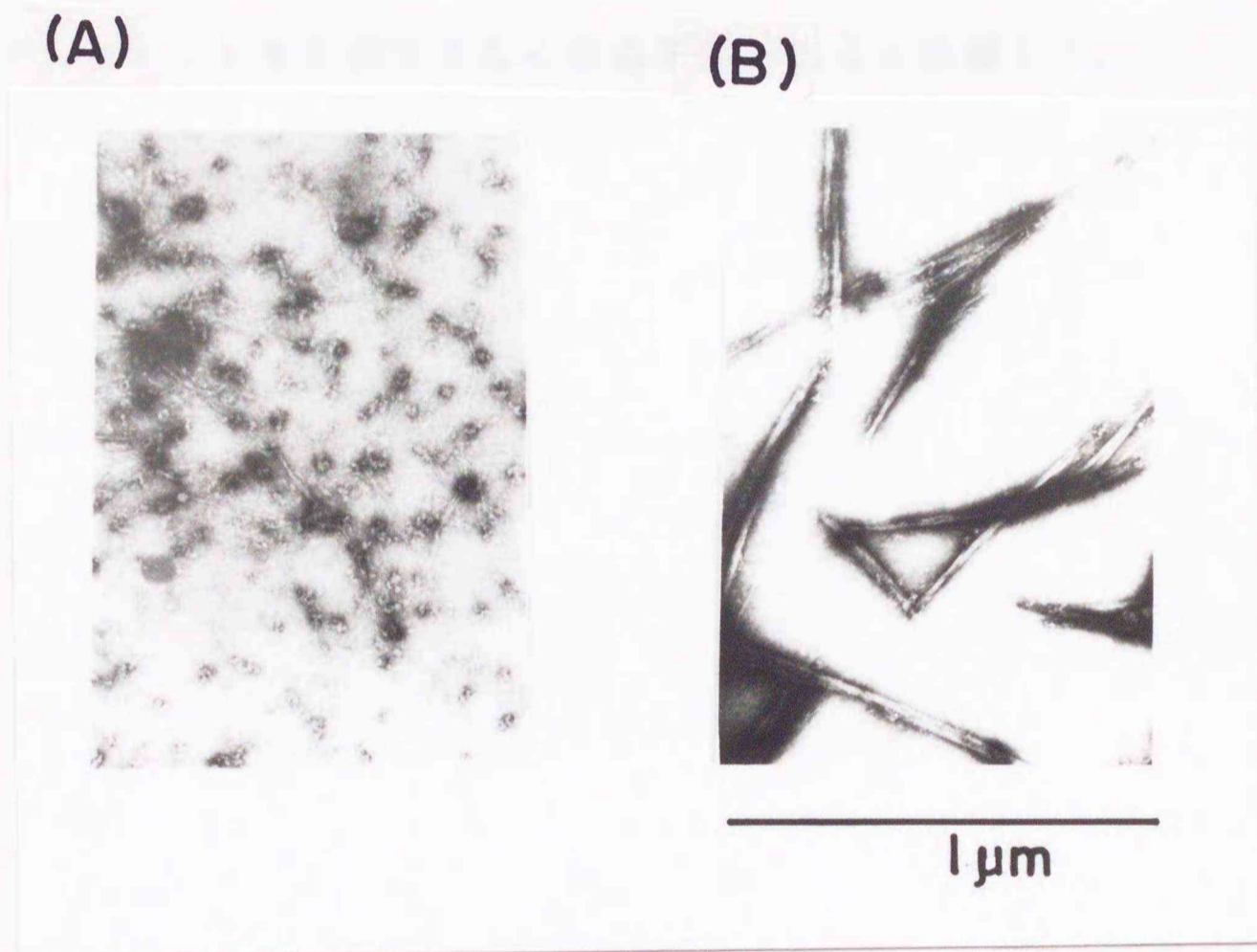


Fig. 92. Electron micrographs of the filament formed by the oligomeric and monomeric forms of rod.

Rods were obtained by Sepharose CL-4B gel filtration shown in Fig. 91 B. Oligomeric rod eluted at fraction No. 14 (A) and monomeric rod eluted at fraction No. 17 (B) were allowed to form filament as in Fig. 82. Electron micrograph of the filaments were taken as in Fig. 32.

オリゴマーミオシンが正常なフィラメントを形成できないことを Fig. 82 で示したが、オリゴマー rod のフィラメント形成能についても検討した。Fig. 91 B に示した加熱ミオシン消化物のゲル濾過溶出フラクションから  $V_0$  の rod 画分、およびモノマー rod (フラクション No 17) 画分を分離して、それぞれ 0.1 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0) 条件下でフィラメント形成させ、電子顕微鏡観察した (Fig. 92)。モノマー rod は正常なフィラメントを形成しているのに対して  $V_0$  画分の rod オリゴマーはフィラメントではなく凝集物しか形成していなかった。以上のことより、加熱によってミオシンは rod 部分で凝集し、これが正常なフィラメントを形成できなくなる原因であると結論した。



Fig. 92. Electron micrographs showing the filament formation of monomer rod and oligomer rod. The top panel shows normal filaments formed from monomer rod (fraction No. 17) and the bottom panel shows aggregates formed from oligomer rod ( $V_0$  fraction) in a solution of 0.1 M KCl and 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) at 25°C. The filaments were prepared as described in Fig. 82. The oligomer rod aggregates the top-right corner of the corresponding Tris-maleate.

次に rod 内で凝集に関与している部位を調べるために、未加熱及び加熱ミオシンを主に HMM 及び LMM が生成する条件 (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、1 mM Ca<sup>2+</sup>) で消化し、ゲル濾過に供した (Fig. 93)。この場合、加熱ミオシン消化物は Vo に大きなピークを示し、この中には HMM 及び 95 kDa、60~70 kDa のバンドが含まれていた。しかし、40k LMM や 33 kDa フラグメントなど LMM 由来の成分は含まれず、これらはモノマーミオシンからのものと同じ溶出位置に同じ程度の量溶出された。そのため、凝集に関与している可能性が高いのは rod 中でも LMM より S-2 であると推測した。

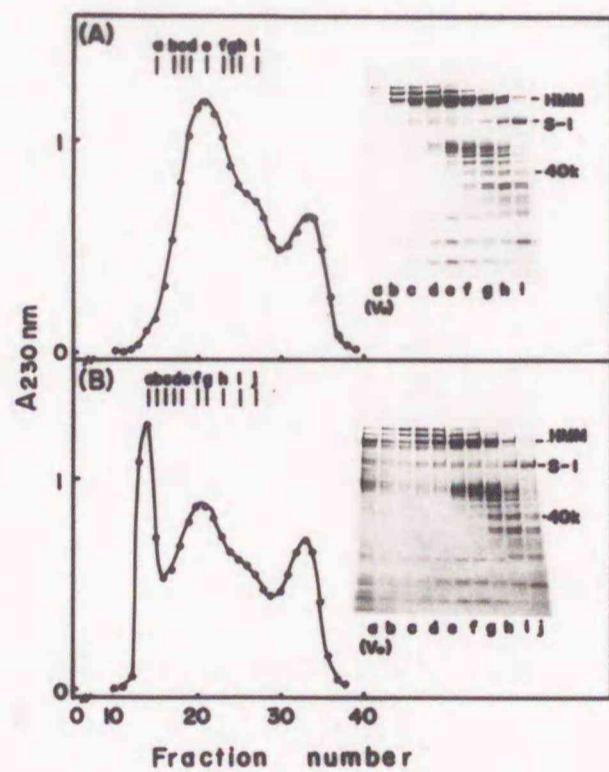


Fig. 93. Sepharose CL-4B gel filtration profile of chymotryptic digest of thermal-treated myosin.

Unheated (A) and heated myosin at 30 °C for 15 min (B) were digested by 1/250 (w/w) chymotrypsin for 20 min at 20 °C in a medium of 0.5 M KCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) and 1 mM CaCl<sub>2</sub>. The digests were applied to Sepharose CL-4B as in Fig. 91. The inserted figures show the SDS-PAGE patterns of the corresponding fractions.

なお、Fig. 93 で  $V_0$  に HMM のオリゴマーが溶出したので、各フラクションの Ca-ATPase 活性を測定した (Fig. 94)。未加熱ミオシン消化物の場合は No 20 の HMM のピークと活性のピークが一致した。一方、加熱ミオシン消化物の場合は HMM のピークのみならず、 $V_0$  画分にも活性が認められた。溶出タンパク質量と比較した活性値は低いものの、 $V_0$  に溶出される HMM オリゴマーの中にも Ca-ATPase 活性を有するものが存在している事が示された。これは、ミオシンオリゴマーも ATPase 活性を有している事と共通している。

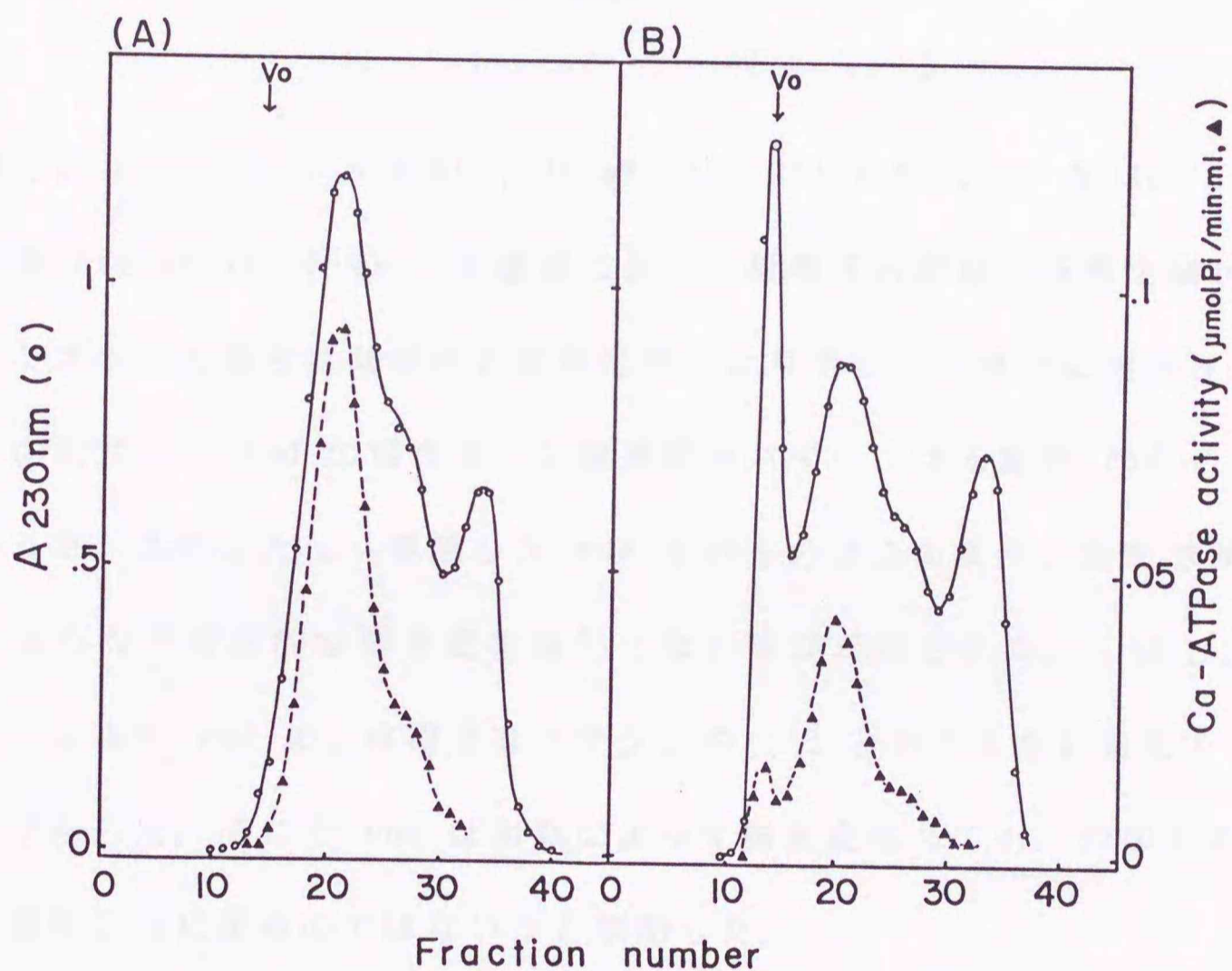


Fig. 94. ATPase activity of the chymotryptic digest of the thermal-treated myosin separated on Sepharose CL-4B.

The elution profiles of the chymotryptic digest of unheated (A) and heated (B) myosin were the same as in Fig. 93. Ca-ATPase activity was assayed (▲) in a medium of 0.5 M KCl, 25 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 5 mM  $\text{CaCl}_2$ .

### 3. 加熱時に起こる単離 rod 及び HMM の構造変化

2. において、オリゴマーミオシンの消化物中には rod オリゴマーと HMM オリゴマーが含まれることが判ったので、加熱によるミオシンの凝集は rod (S-2) 部分で起こる可能性が指摘された。ここではミオシンから単離した rod 及び HMM を加熱処理したときの変化について検討した。

#### (1) 加熱時に起こる rod の構造変化

単離したコイ rod (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) を 30 °C 30 分加熱した後 Sepharose CL-4B ゲル濾過に供し、凝集体の形成の有無を調べた (Fig. 95)。ミオシンの場合は同条件の加熱処理により全て  $V_0$  画分に溶出されるようになるのに対し、rod の場合はゲル濾過溶出パターンは未加熱 rod と全く変わらなかった。このことは、単離した rod そのものはこの条件の加熱で凝集反応を起こすような不可逆的な構造変化は生じない事が示唆された。しかし、変性剤 (尿素) により rod の立体構造はミオシンや S-1 と同じくらい変化することを第 1 章で示した。そこで rod は加熱によって構造変化しても、冷却することによって可逆的に元に戻るのではないかと推測した。

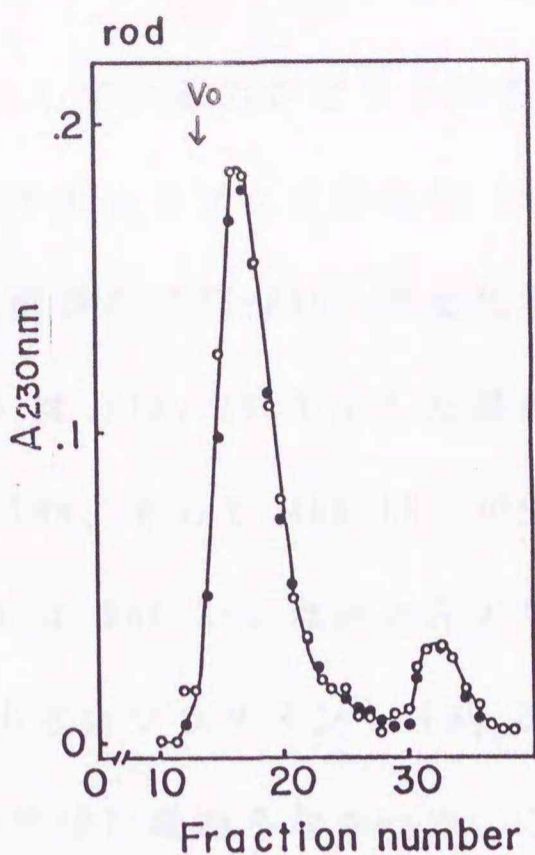


Fig. 95. Sepharose CL-4B gel filtration profile of thermal-treated carp rod.

Carp rod in a medium of 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was heated at 30 °C for 30 min, and applied to Sepharose CL-4B gel column. Unheated (○) and heated (●) rods were used.

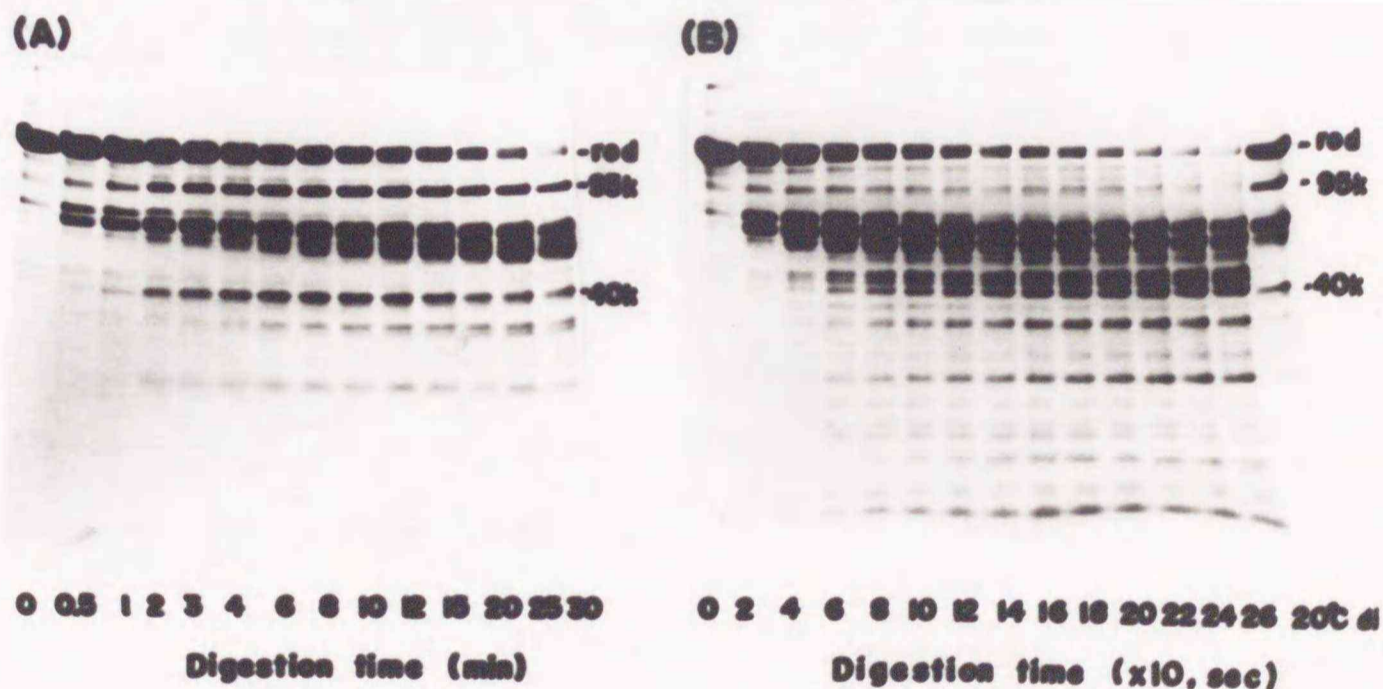


Fig. 96. Effect of digestion temperature on the digestion profile of carp rod.

Carp rod in a medium of 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) was digested by using 1/250 (w/w) chymotrypsin at 20 °C (A) and by using 1/1000 (w/w) chymotrypsin at 35 °C (B). Rod, 95k and 40k are rod, 95k S-2 and 40k LMM, respectively.

加熱中に rod が構造変化しているのかどうか知るため、rod (0.5 M KCl、20 mM Tris-HCl (pH 7.5)) のキモトリプシン消化を 35 °C で短時間行い、20 °C で消化した場合と比較した。両者の SDS-PAGE 図変化を Fig. 96 に示す。20 °C で消化した場合 (Fig. 96 A) は Fig. 19 で示した結果と同様に 95k S-2、70~60 kDa のサイズの S-2 及び LMM、そして 40k LMM が生成していた。一方、消化温度が高い場合 (Fig. 96 B) は 95k S-2 はほとんど生成されなくなり、通常の S-2、LMM よりもサイズが小さいフラグメント (約 50 kDa 付近) の生成も認められた。しかし、40k LMM の生成は変わらなかった。このように高温での rod の消化パターンがかなり変化する事から考えて、加熱中は rod も構造変化していることが示唆された。

しかし、加熱 rod も消化温度を 20°C とすると未加熱 rod と全く同じ消化パターンを示した (図示せず) ので、加熱中による構造変化は冷却すると完全に元に回復することが明らかとなった。つまり、本研究で行った程度の弱い加熱で引き起こされる rod の構造変化は全て可逆的な変化であった。

## (2) 加熱時に起こる HMM の凝集反応

次に HMM を加熱したときの凝集反応について検討した。コイ HMM を 30°C で 10 分及び 30 分加熱したときの Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図型変化を Fig. 97 に示す。

未加熱 HMM はフラクション No 20 に均一なピークとして溶出された。しかし、10 分加熱した HMM (Fig. 97 B) では新たに  $V_0$  に溶出される成分が検出された。更に加熱時間を長くした場合 (Fig. 97 C) はモノマーの HMM のピークはかなり小さくなり、代わって  $V_0$  のピークが大きくなった。このため HMM はミオシンと同じように加熱によってオリゴマーを形成することが明かとなった。さらに、溶出された各フラクションの K-ATPase 活性を測定し、Fig. 97 中に示した。それによると、 $V_0$  画分の HMM も活性は低いものの ATPase 活性を有していることが示された。よって、HMM もミオシン同様に ATPase 活性を保持したままでオリゴマーを形成している事が明かとなった。

この HMM 中での凝集部位についての情報を得るため、未加熱及び加熱 HMM を EDTA 中でキモトリプシン消化し、S-1 と S-2 に切断した後にゲル濾過に供した (Fig. 98)。加熱 HMM 消化物は  $V_0$  に主なピークを示し、その中に含まれる成分を SDS-PAGE で調べると、消化されずに残る HMM もあるので判りにくいですが、S-2 由来のバンドも検出されたので、S-2 部分も凝集に関与していることが推測された。

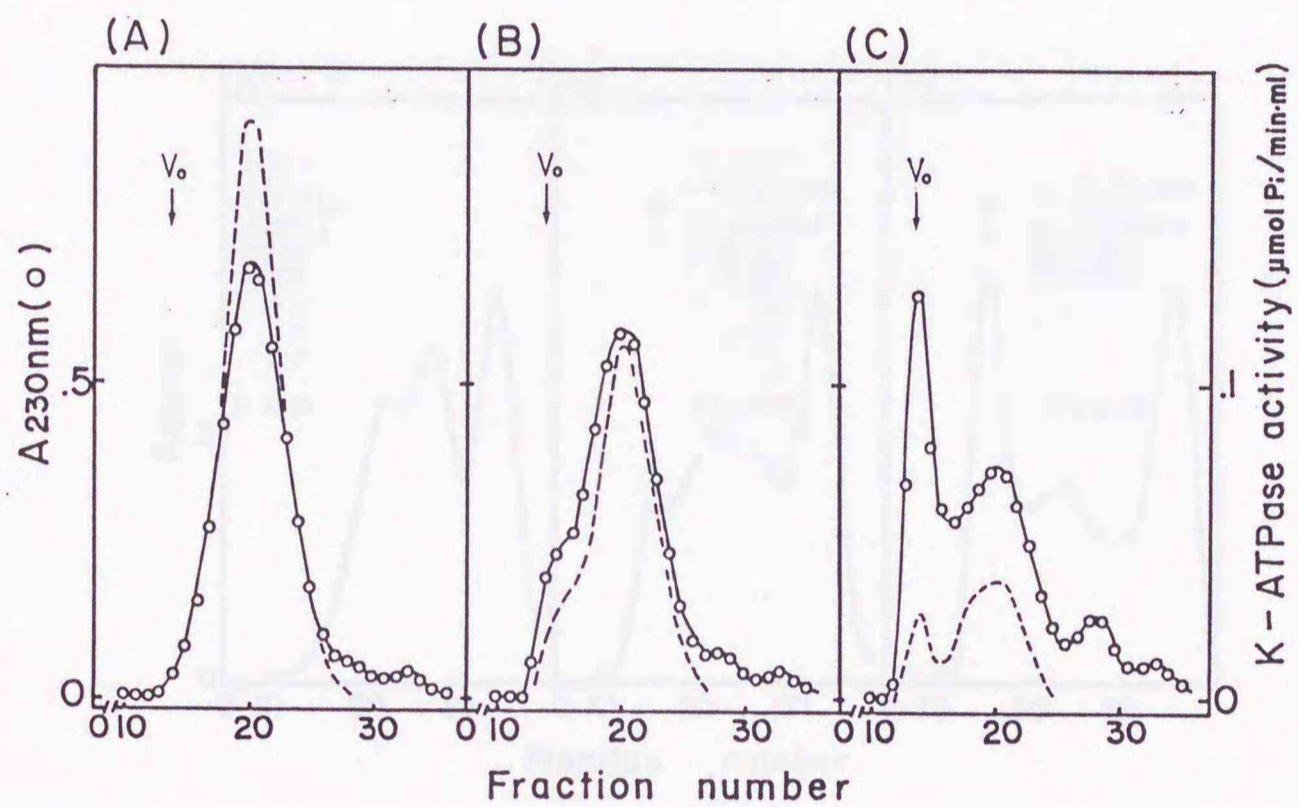


Fig. 97. Oligomerization of carp HMM by thermal treatment. Carp HMM was heated at 30 °C for 0 min (A), 10 min (B) and 30 min (C), and applied to Sepharose CL-4B gel column. Elution profile (○) and K-ATPase activity (dashed lines) of the fraction separated were measured as in Fig. 78.

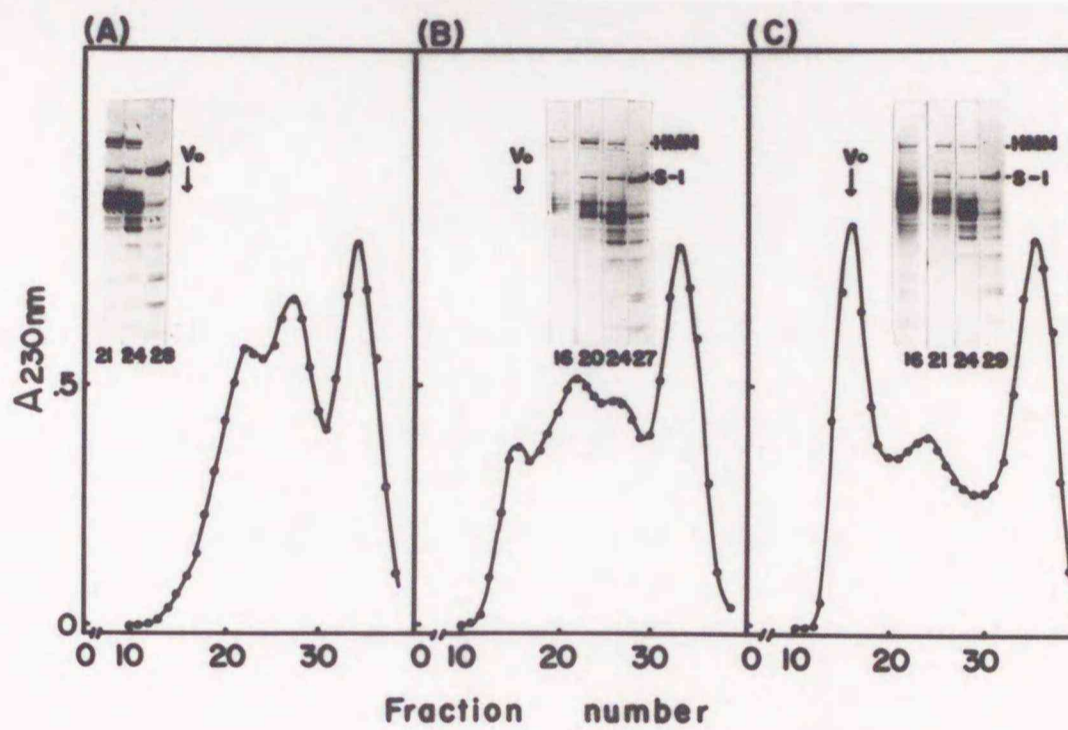


Fig. 98. Sepharose CL-4B gel filtration profile of the chymotryptic digest of the carp HMM.

The same HMMs as in Fig. 97 were digested by chymotrypsin (1/250, w/w) in a medium of 0.5 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), and were applied to Sepharose CL-4B. (A), (B) and (C) were digest of unheated, heated for 10 min and 30 min at 30 C°, respectively. Fraction numbers are shown below the gels.

#### 4. ウサギ・ミオシンの加熱凝集反応

##### (1) 加熱により起こるウサギ・ミオシンの凝集反応

これまでコイ・ミオシンを用いて ATPase 失活を伴わない加熱初期の凝集反応を調べてきた。これが魚類ミオシンに特殊な反応であるのか、あるいは普遍的に起こる反応なのか知るために、ウサギ・ミオシンを用いて比較検討した。

まず、35°C で 20 分間加熱したウサギ・ミオシンを Sepharose CL-4B ゲル濾過に供したところ (Fig. 99)、ウサギ・ミオシンにおいても ATPase 活性を有したオリゴマーのピークが  $V_0$  に現れた。このためウサギ・ミオシンにおいても凝集反応は ATPase の失活を必ずしも伴わない事が示された。

この加熱ミオシンを S-1/rod junction で切断される条件 (Fig. 100 A) あるいは HMM/LMM junction で切断される条件 (Fig. 100 B) でキモトリプシン消化し、ゲル濾過に供した。まず、Fig. 100 A を見ると、加熱ミオシン消化物中のモノマー rod のピーク (No 20) が半分程度まで小さくなっており、新たに  $V_0$  に rod オリゴマーから成るピークが現れ、ウサギ・ミオシンでも rod 部分での凝集が起こっていることが明らかとなった。

一方、Fig. 100 B をみると、加熱ミオシン消化物の溶出図には  $V_0$  に HMM オリゴマーを含むピークが現れた。これらの結果はコイ・ミオシンで得られた結果と共通しており、ウサギ・ミオシンでも S-2 部分で凝集が起こっていることが推測された。

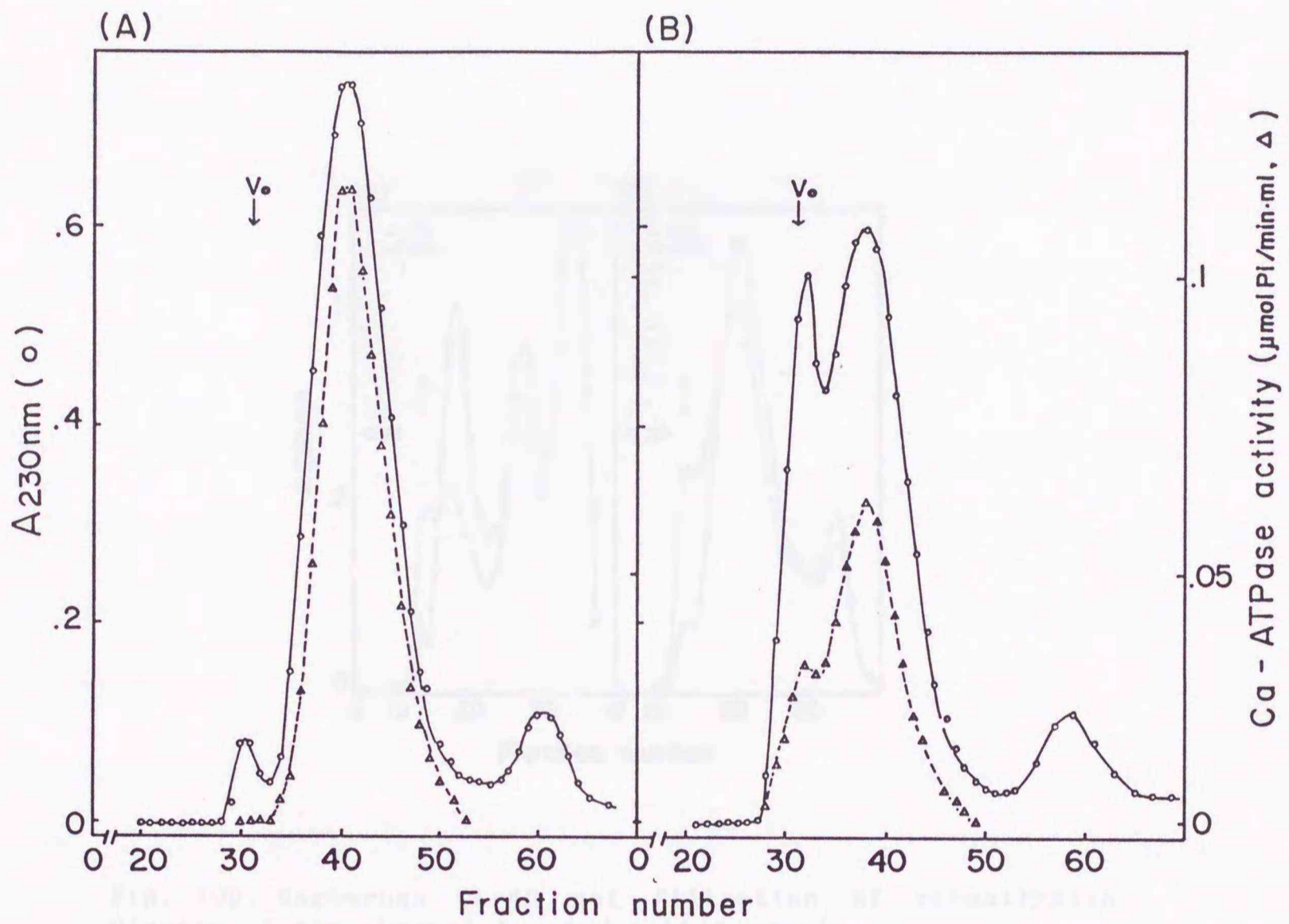


Fig. 99. Sepharose CL-4B gel filtration profile of thermal-treated rabbit myosin.

Unheated (A) and heated rabbit myosin at 35 °C for 20 min (B) were applied to Sepharose CL-4B. Ca-ATPase activity of the fractions was also measured as in Fig. 79 A.

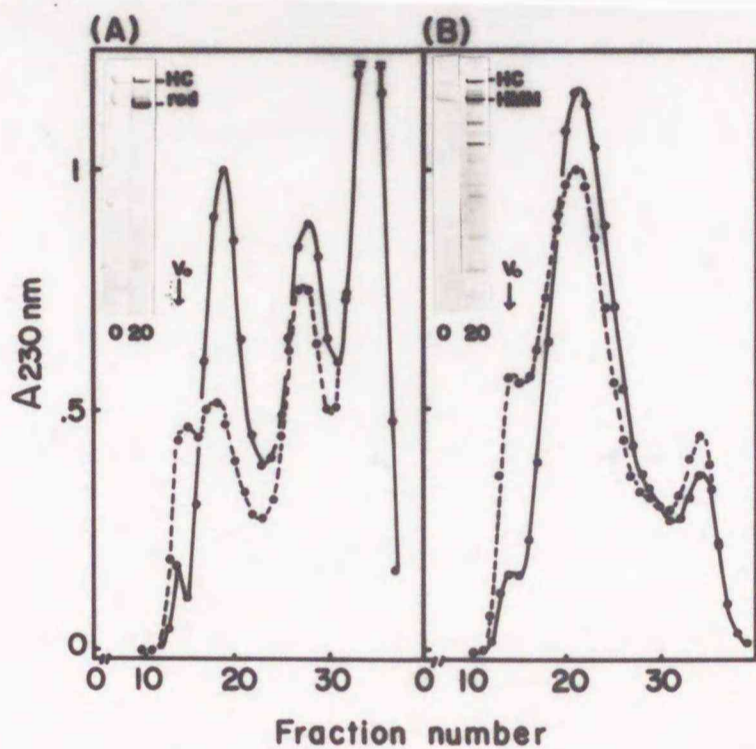


Fig. 100. Sepharose CL-4B gel filtration of chymotryptic digests of the thermal-treated rabbit myosin.

Unheated (○) and heated myosin (●) as in Fig. 99 were digested by using 1/250 (w/w) chymotrypsin at 25 °C for 30 min in a medium of 0.05 M KCl, pH 7.0 and 1 mM EDTA (A) or 0.5 M KCl, pH 7.5 and 1 mM CaCl<sub>2</sub> (B). The other conditions are the same as Fig. 91. Inserted SDS-PAGE patterns are of V<sub>0</sub> fractions. 0 and 20 at the bottom of the SDS-PAGE patterns denote heating period (min) at 35 °C.

## (2) ウサギ・ミオシンの加熱によるキモトリプシン消化性の変化

既にコイ・ミオシンを加熱すると、キモトリプシン消化性が変化し、rod 様のフラグメント (rod') が生成するようになる事を述べた。そこで、ウサギ・ミオシンを加熱した時のキモトリプシン消化性の変化についても検討を加えた。35°C で加熱したミオシンを 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM EDTA 中でキモトリプシン消化した。消化物は超遠心分離して水溶性画分と塩溶性画分に分画した。消化物と両画分の SDS-PAGE 図を Fig. 101 に示す。

この消化条件では未加熱ミオシンは rod と S-1 に切断されたが、加熱に伴い消化パターンが複雑になっていった。加熱に伴い S-1 生成量が減少し、その変化は ATPase の失活に対応する点はコイ・ミオシンの場合と同じであった。また、加熱に伴って rod よりもサイズの大きいバンドが 2 本現れ、また 40 kDa のバンドも生成するようになった。この 2 本のバンド及び 40 kDa の成分は全て塩溶性画分に回収され、水溶性画分には主として S-1 のみが検出された。SDS-PAGE 図で rod のすぐ上に現れるバンドのサイズは加熱したコイ・ミオシンから生成した rod' と同じであった。

図示しないが 1,5 IAEDANS で S-1 の SH1 を蛍光ラベルしたミオシンを用いて同じ実験を行ったところ、HC、S-1 及び 170 kDa のバンドに蛍光が認められ、rod' には蛍光は検出されなかった。よって、rod' は S-1 の SH1 を含まない断片であり、一方、170 kDa は SH1 を含む HMM 様のフラグメントである事が予想された。この 170 kDa と 40 kDa のフラグメントはコイ・ミオシンが 95k S-2/40k LMM junction で切断されて生成する long HMM (170 kDa) と、40k LMM のサイズと一致する。この 170 kDa フラグメントと 40 kDa フラグメントは共にゲル

濾過で  $V_0$  に溶出されオリゴマーとして存在していた。また、硫酸分画、エタノール分画などで両者を分離しようといろいろ試みたが、この2種のフラグメントは同じ挙動を示し、分ける事はできなかった。このため、これらはオリゴマーミオシンの内部開裂フラグメントである可能性が高い。

rod'、及び 170 kDa 成分の生成が消化条件でどのように変化するかを知るため、条件を変えて加熱ウサギ・ミオシンを消化した。Fig. 102 は 0.05 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM  $Ca^{2+}$  存在下で消化した場合の SDS-PAGE 図であるが、この条件では未加熱ウサギ・ミオシンは非常に消化を受け難く、少量の HMM と LMM が生成していた。一方、加熱ミオシンでは、この他に 170 kDa 及び 40 kDa 成分の生成が認められ、その量は加熱時間の長いミオシンの方が多傾向にあった。

以上の結果より、ウサギ・ミオシンを加熱した場合も ATPase 活性を有したままでミオシン分子のオリゴマーへの変化が起こることが判り、ミオシンの凝集に関わる部位も基本的にはコイ・ミオシンの場合と良く似ていると結論した。しかし、その結果引き起こされる見かけのキモトリプシン消化性の変化は必ずしもコイ・ミオシンで起こる変化と同じとはいえなかった。すなわち、加熱ミオシンのフィラメント状態での消化で rod' が生成されることはコイ・ミオシン加熱時の変化と同じであったが、ミオシン HC が 170 kDa と 40 kDa フラグメントに内部開裂するという、コイ・ミオシンには見みられない変化も起こった。後者の分解はコイ・ミオシンで見いだされた 95k S-2/40k LMM junction に相当する部位で加熱ウサギ・ミオシンが内部開裂した為と考えられた。魚類ミオシンでは未加熱の状態でもこの部位で切断が起こるため、加熱の影響は見かけ上出現しないと思われた。

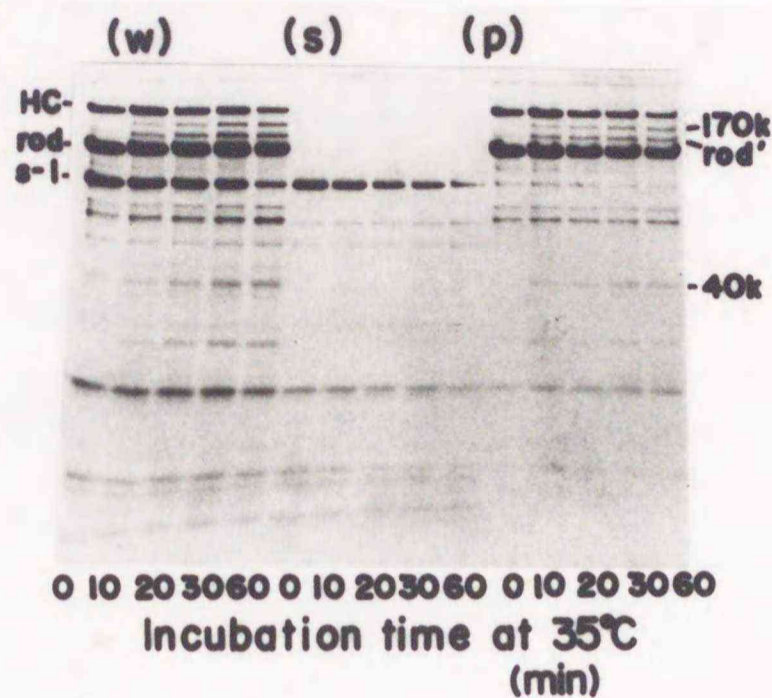


Fig. 101. SDS-PAGE patterns of the chymotryptic digest of the thermal-treated rabbit myosin.

Thermally treated rabbit myosin at 35 °C was digested by 1/250 (w/w) chymotrypsin at 25 °C in a medium of 0.05 M KCl, pH 7.0 and 1 mM EDTA. The digests (w) were separated into the water soluble (s) and the water-insoluble fraction (p) by centrifugation of the digests. 170k and 40k are fragments of 170 kDa and 40 kDa. rod' is a rod-like fragment.

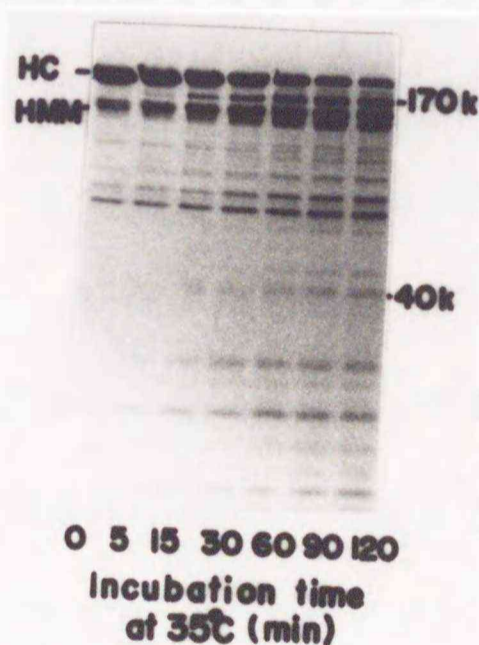


Fig. 102. Digestion profile of the thermal-treated rabbit myosin.

Thermal treatment for rabbit myosin was carried out as in Fig. 101. Digestion was performed in 0.05 M KCl, pH 7.0 and 1 mM CaCl<sub>2</sub>. The other conditions are the same as in Fig. 101 except that the digestion period was 30 min. The same abbreviations as in Fig. 101 are used.

## 5. 小考察

この章ではミオシンの加熱変性にともなうミオシン各部の変性がどのように進行するのかについて検討した。ミオシンの変性の程度は ATPase 活性の失活を指標として測定している例が多いが、その場合は S-1 特に ATPase 活性中心近傍以外の部分の変化を知る事はできない。そこで、ミオシン分子特に rod 部分の構造変化をゲル濾過、ATPase 活性失活、及びキモトリプシン消化性を組み合わせて検討した。

加熱による コイ・ミオシンの ゲル濾過溶出図の変化を調べる事により、Ca-ATPase があまり失活していないような加熱の初期段階においてオリゴマーへの凝集反応が進行している事を見いだした。このオリゴマーは ATPase 活性を有しているので、ミオシンの凝集は必ずしも ATPase 失活の後に起こる変性のステップではなく、失活とは独立して起こっていると考えられた。

本研究では凝集部位の同定のためにキモトリプシン消化法を用いたが、この方法によると変性 S-1 は小断片化されるので、S-1 部分で起こっている凝集については検出できない。オリゴマーミオシンの ATPase 活性値が低下している事から、S-1 部分で変性凝集したミオシンも含まれていると考えられる。Yamamoto (1990) 及び Yamamoto (1993) らはウサギ・ミオシンの加熱変性や高圧変性時にはミオシン分子が S-1 部分で凝集する事を電子顕微鏡観察から認めている。ただし、これは ATPase 失活後に起こる反応であり、本研究で見いだしたオリゴマー生成は ATPase 失活より速い事、また、rod 部分でオリゴマーとなっている事から、S-1 だけが凝集反応に関与している訳ではない事を明らかにした。よって、少なくとも S-1 部分の凝集と rod 部分での凝集反応が独立して起こっており、また両方

の部分で凝集しているオリゴマーも含まれていると考えた。

ゲル濾過で分離した加熱凝集ミオシンは正常なフィラメントを形成できず、非常に短いものや、不規則な集合体を形成していた。加熱ミオシンから調製した rod オリゴマーも、正常なフィラメントを形成できなかった。このため、ミオシン分子が rod 部分で凝集してしまうと、分子同士が規則正しく配列できなくなり、分子集合能を失うと推測した。第2章において、rod を EDC で分子間架橋した場合、少量の rod 分子間架橋物によってフィラメント形成が著しく阻害を受ける事を示したが、加熱によるオリゴマー生成の場合も似た効果を引き起こす可能性がある。

更に、加熱凝集したミオシンを低イオン強度下でキモトリプシン消化すると、rod よりも長い rod' が検出されたが、これは本来切断されてしまうミオシンの C 末端部分が除去されずに生成した長い rod である事が示された。この rod' は全てオリゴマーとして存在していたので、オリゴマーミオシンから生成していると思われた。また、加熱ミオシンを高イオン強度条件下で消化した場合に rod' は生成しなかったため、オリゴマーミオシンのフィラメント形成が変化したために生成されたものと考えられる。このように rod 部分の凝集によって、フィラメント形成能が変化し、消化性の変化や急激な Mg-ATPase 失活といった現象が現れる事が明かとなった。また、rod 部分の凝集は LMM よりも、S-2 部分で起こっている可能性が高い事がキモトリプシン消化性から示された。

加熱による凝集反応、フィラメント形成能の変化、キモトリプシン消化性の変化はコイでもウサギ・ミオシンでも共通して起こったので、ミオシンの加熱変性様式は普遍的であると思われる。ウサギ・ミオシンの加熱時には rod 部分の構造変化を示す新しい現象が起こる事を発見した。すなわち本来、ウサギ・ミオシン

の場合にはキモトリプシンで切断されないはずの rod 上の部位が、ミオシンを加熱する事により切断されるようになった。それはコイ・ミオシンで見いだした 95k S-2/40k LMM junction に相当する部位であり、消化生成物は 170 kDa と 40 kDa フラグメントであった。既に尿素存在下でウサギ rod をキモトリプシン消化すると 40k LMM 様フラグメントが生成する事を示したが、尿素や加熱により、この部分の構造をルーズにした時に切断が起こるものと思われる。

さて、ミオシン rod 部分で起こる凝集反応は S-2 部分で生じる可能性が高い事を示したが、凝集に関わるミオシン各部分の相互作用について考察した。Fig. 103 に同条件で 30 °Cで 30 分加熱したコイ・ミオシン (A)、HMM (B)、及び rod (C) の Sepharose CL-4B ゲル濾過溶出図を示し、これらを比較した。この加熱によってミオシンの場合は全てがオリゴマーとなり、凝集反応は非常に速く進行しているのに対し、HMM の場合には凝集反応は起こっているものの、モノマー HMM もかなりの量が検出され、ミオシンよりも凝集の進行が遅いことが判る。そして rod の場合は凝集は全く認められなかった。凝集が起こるのは S-1 部分を有している標品であることから、一見すると S-1 部分でのみ凝集が起こるように見える。しかし、このミオシンは rod 部分でもオリゴマーとなっている事を先に示した。また、ミオシンと HMM でもその進行は異なる。このため、ミオシン中の rod 部分の凝集は S-1 及び LMM 部分の存在に影響されると考えられる。この点について以下に考察した。すなわち、S-1 を欠いた rod では S-1 による物理的な構造の束縛がないため、S-2 で起こった構造変化は冷却することにより可逆的に元に戻ると考えられる。しかし、S-1 部分が結合した HMM では S-2 で起こった構造変化は物理的に元に戻りにくくなると考えた。

それでも HMM では S-2 の C 末端が自由であるので、不可逆的変化の程度は小

さいものと推測した。そしてミオシン分子全体では S-2 部分に S-1 や LMM が結合しているので、S-2 の構造回復は両側から束縛され一度起こった構造変化はより不可逆的になると考えた。

このようにミオシン分子内の各ドメインが単独で存在する場合と、それらのドメインが互いに結合している場合とで、不可逆的構造変化の起こり方は全く違っていた。そのために、ミオシンの構造変化には各ドメイン間の相互作用がかなり影響しているものと推測した。いずれにしてもミオシン加熱初期におこる凝集反応はミオシンという巨大分子において特徴的に起こる変化であると結論した。

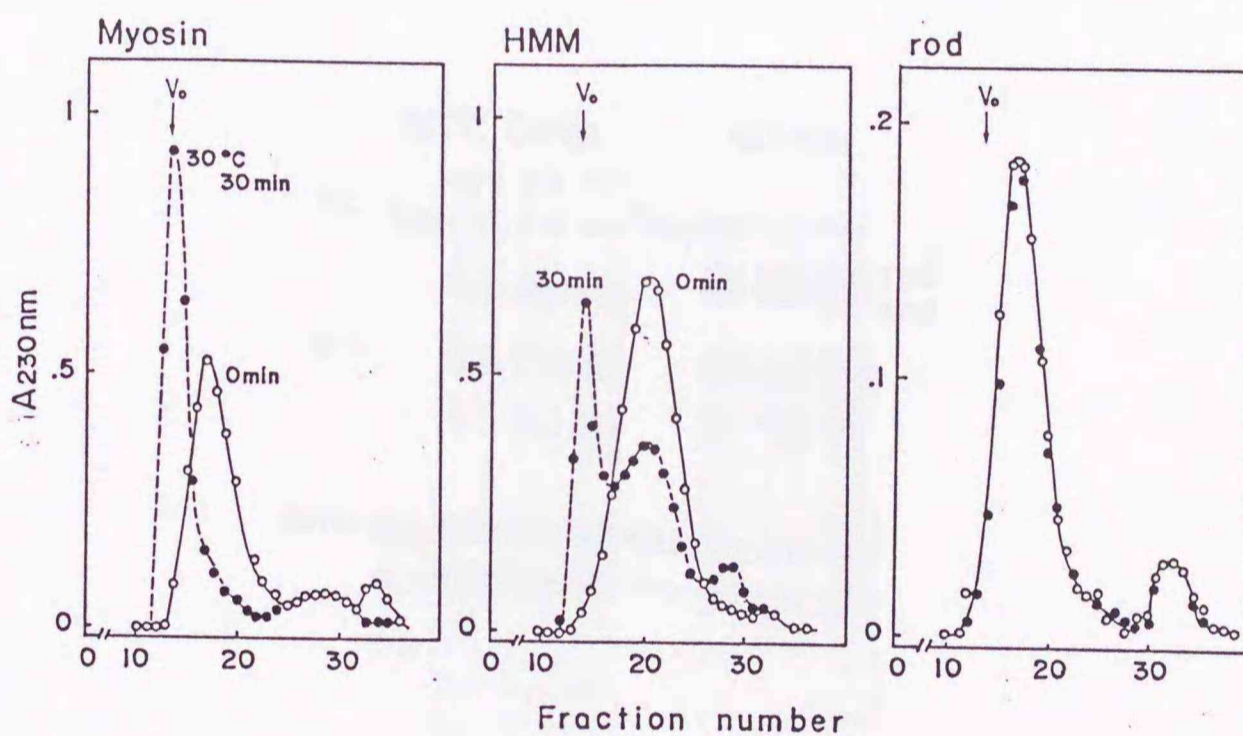


Fig. 103. Comparison of the elution profile of the thermal-treated myosin, HMM and rod from carp.

Unheated (○) and heated (●) samples for 30 min at 30 °C were applied to the Sepharose CL-4B gel column.

最後に、筋原線維中のミオシンにおける凝集反応について考察する。本章でも述べたように、加熱筋原線維からのミオシン収量の低下は Ca-ATPase 失活より速く起こるが（小関ら、1991）、これは Ca-ATPase を有していても 40 % 飽和硫酸で沈澱する凝集ミオシンが存在している為である。Fig. 104 に、35°C で加熱した筋原線維を 0.1 M KCl、20 mM Tris-maleate (pH 7.0)、1 mM EDTA 条件でキモトリプシン消化したときの SDS-PAGE 図を示すが、加熱筋原線維中のミオシンからも rod 様フラグメント (rod') が生成しているのが判る。この rod' 生成は加熱時の筋原線維溶液の KCl 濃度が 0.1 M でも 0.5 M でも起こる事を定性的に確かめている。従って、ミオシンは筋原線維中でアクチンと結合した状態でも rod 部分で凝集し、その反応は ATPase の失活よりも速いと推測した。

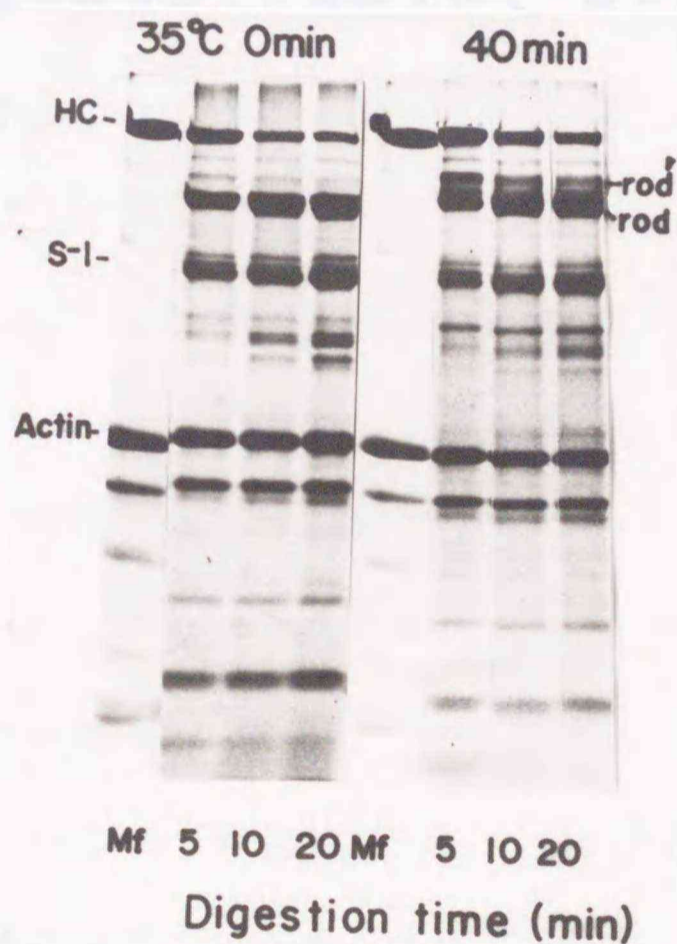


Fig. 104. Chymotryptic digestion profile of heated carp myofibrils.

Carp myofibrils in 0.1 M KCl and 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) were heated at 35 °C for 40 min, and were digested in a medium of 0.05 M KCl, 20 mM Tris-maleate (pH 7.0) and 1 mM EDTA by using 1/500 (w/w) of chymotrypsin at 20 °C. The same abbreviations as in Fig. 101 were used.

ミオシンは筋原線維タンパク質の約半分を占める主要なタンパク質であり、生体内では、規則正しく配列した太いフィラメントとして存在している。このフィラメントが、ATPのエネルギーを利用して細いフィラメント（主にアクチンからなる）と相互作用することにより筋収縮が起こる。この筋収縮の分子メカニズムの解明には、ミオシンの各種生理機能（ATP分解能、アクチン結合能、フィラメント形成能）及び、その相互関係を理解する事が必須であり、多くの研究者がそのような研究に取り組んでいる。

また、筋肉を食品として捉えた場合、ミオシンは食肉の主要タンパク質であるのでその性質を知る事は食品加工上重要となる。特に魚類ミオシンは畜肉のそれと比較して、変性が非常に速く起こる事、また魚種によりその速度は異なり、生息水温が低いものほど不安定であることが知られている。魚類ミオシンの構造安定性や変性機構を知ることは魚肉の保蔵、加工処理中の製品の品質を制御するためには不可欠である。しかし、ミオシンは巨大分子でその構造が複雑であり、更に塩溶性であるので、通常の生化学的研究法がそのまま適用できず、そのために研究が困難となっている。これまでの魚類ミオシンに関する研究は水溶性で酵素活性（ATPase）を持つ頭部 S-1 部分について集中的に行われ（山本ら、1989；浜井ら、1989；Hamai & Konno, 1990）、特に ATPase 活性の失活速度と S-1 の構造安定性の関係などが調べられている。それに対して、フィラメント形成能を担っている尾部に関する研究は非常に少ない。魚種によるミオシンのフィラメント形成能の違いについては松浦ら（1985）が研究を行っているが、rod を単離し、その構造特性を調べるというような、魚類 S-1 で行われているような分子レベル

の研究はほとんど行われていない。また、ミオシンの熱変性の初期には S-1 の Ca-ATPase 活性の失活より先にフィラメント形成能が変化する事が Kimura ら (1980) や田中ら (1982) によって明らかにされているが、これも rod 部分の構造変化を積極的に見たものではない。

本論文では魚類ミオシン尾部に注目して、その内部構造と機能の関係、さらには構造安定性を知る事を目標とした。すなわち、生化学的見地から、フィラメント形成における rod 分子内の各部分の役割について、更に、食品化学的見地からミオシンの加熱時に起こる rod 部分の構造変化について、それぞれ分子内構造と関連づけて検討し、魚類のうちで、主にコイについて rod の持つ構造特性を明らかにしようとした。

第1章ではキモトリプシン消化法を用いてコイ・ミオシンの構造特性を見いだす事に成功した。第1にコイ・ミオシンの S-1/rod junction は  $Ca^{2+}$  が存在していてもキモトリプシンによる切断が起こることから、ウサギの同部位に比べてかなり脆弱な構造である事が判った。第2に、コイ・ミオシンの rod 内部 (特に LMM 内部) において、ウサギ rod でよく知られている HMM/LMM junction の他に、95k S-2/40k LMM junction という特有のキモトリプシン切断部位が存在する事を見出した。これまで、魚類ミオシンとウサギ・ミオシンは安定性が異なるだけで、構造上の違いは検出されていなかったが、この junction は初めて見いだされた魚類ミオシンの構造特性である。各種魚類 rod をキモトリプシン消化したところ、同タイプの消化生成物が検出された事から考えて、この junction は魚類ミオシンにかなり普遍的に存在しているものと思われる。ただし、その切断のされ易さは魚種間で異なっていた。95k S-2/40k LMM junction は rod では速く切断されるが、LMM においては切断されにくくなる事を見いだしているので、HMM/

LMM junction での切断が速く起こる魚類 rod では 95k S-2/40k LMM junction は切断されにくいのではないかと思われた。もしくは、95k S-2/40k LMM junction の立体構造の脆弱さが魚種によって多少異なっているのかも知れない。なお、95k S-2/40k LMM junction の切断され易さとミオシンの安定性あるいはフィラメント形成能との関係の間に直接の因果関係は認められなかった。

未変性のウサギ・ミオシンでは通常この 95k S-2/40k LMM junction での切断は起こらないが、加熱や変性剤の添加によって、内部開裂とは思われたが、切断が起こるようになる事を見いだした。ウサギ及びニワトリのミオシンの一次配列から予測した rod の 2 次構造によると、rod 内には局所的に  $\alpha$ -ヘリックスのほぐれた部分が数カ所あるが、丁度この junction 付近もそのひとつと考えられた。そのため、ウサギ rod においてもこの部位の構造は脆弱であり、熱や尿素によるわずかな立体構造のほぐれによって消化を受ける様になるのであろうと考えられる。魚類ミオシンの場合には、未変性状態でも既にこの構造はほぐれていることとなり、その意味では魚類 rod の構造安定性はウサギより劣るともいえる。rod 内での局所的な構造安定性の他に、コイ及びウサギ rod の全体的構造安定性を知るため、尿素変性について検討した。その結果コイ rod の構造変化はウサギ rod の場合より低濃度（約 1/2）の尿素で起こったので、rod の立体構造もコイの方が不安定である事がわかった。また、rod と S-1 は同程度の濃度の変性剤で構造が変化するので、rod は S-1 と同じくらい構造が破壊されやすい事も示唆された。

コイ rod が 95k S-2/40k LMM junction で容易に切断されるので、各機能ドメインに分ける事ができた。特に、フィラメントを形成するものとしてはこれまで報告されたうちで最も短い断片である 40k LMM を単離する事ができた。40k LMM

は rod の C 末端部分に位置する断片で、そのひとつの特徴として総負電荷が小さい事が挙げられる。このことは尿素電気泳動上の移動度が小さい事、イオン交換樹脂への吸着能が劣る事、また等電点が高い事から明らかにした。この性質は単離に成功したコイ、ティラピア、ウサギの 40k LMM に共通していたので、ミオシン rod 分子表面の電荷は片寄って存在している事が示された。

第2章では第1章で単離した 40k LMM のフィラメント形成能について rod や通常の LMM と比較した。その結果、中性の条件において、40k LMM は side-by-side に非常に集合し易く、幅広いパラクリスタルを形成する事を見いだした。また、もうひとつの特徴はフィラメント形成に対して  $Mg^{2+}$  が影響を及ぼさず、 $Mg^{2+}$ 非存在下でもよく自己集合する事であった。この  $Mg^{2+}$ 要求性は LMM と rod では同様に検出されたので、 $Mg^{2+}$ 反応部位は 40k LMM 以外の部位すなわち通常の LMM の N 末端である事を推定した。これらの結果を基に、rod をその機能から3つのドメインに分ける事ができた。すなわち、rod C 末端部分から順に、①フィラメント形成ドメイン (40k LMM)、②  $Mg^{2+}$ によるフィラメント調節部分 (20 kDa)、③分子の side-by-side の集合を物理的に防ぎ、フィラメントの形を整える S-2 部分 からなると結論した。rod 上における  $Mg^{2+}$ 相互作用部位については、従来ミオシンフィラメントのキモトリプシン消化性が変わる事から、HMM/LMM junction 付近であろうと考えられていたが、本論文の結果はこれよりもやや C 末端側の LMM 上にある事を示した。また、40k LMM ドメインの自己集合能において、コイとティラピア で比較すると、ティラピア ではその能力が明らかに劣り、この部分の自己集合能が魚種間の試験管内のミオシンフィラメント形成能を決定づけている事を推定した。

40k LMM や化学修飾 rod を用いたフィラメント形成能の実験結果から、ミオシ

ンのフィラメント形成における  $Mg^{2+}$  添加効果、及び pH 低下の効果は分子表面の負電荷量を低下させることである、と考えるとかなりの現象の説明がつく事を示した。すなわち、 $Mg^{2+}$  は rod や LMM の余分な負電荷に作用し、電荷のバランスを整えて自己集合能を高めると考えられ、さらに pH の低下も相対的に負電荷量を小さくするという同じ効果をもたらしていると考えられた。この考えを支持するように、rod のカルボキシル基に GEE を EDC 架橋させ、負電荷を消失させることにより自己集合能が高まり、また  $Mg^{2+}$  要求性もなくなって、40k LMM とよく似た挙動を示すように機能改善できた。そして逆に rod のアミノ基を修飾すると、自己集合しにくくなる事も確かめたので、rod の自己集合のかなりの部分は静電的な相互作用に依存している事を推定した。

また、第3章においてはミオシンを加熱した時に起こる rod 部分の構造変化を検討した。ミオシンは加熱のかなり初期の段階で凝集し、オリゴマーを形成する事を発見した。この凝集オリゴマーは Ca-ATPase 活性を有している事から、S-1 部分の変性が起きていないミオシン分子が凝集している事が示され、凝集反応は必ずしも Ca-ATPase の失活に続くような遅い変化ではない事が判った。このオリゴマーミオシンは低イオン強度下で正常なフィラメントを作れず、不規則に集合した凝集物となっている事を電子顕微鏡観察により確かめた。この凝集オリゴマーミオシンをキモトリプシンにより S-1/rod junction で切断しても、生成 rod の多くは、なおもオリゴマーとして存在しているため、rod 間で凝集反応が起きている事を示した。そして凝集オリゴマーの rod もまた、低イオン強度下でのフィラメント形成能を失っており、凝集オリゴマーミオシンと同様の性状を示した。既に Kimura ら (1980) もミオシンの加熱初期にフィラメント形成能が劣化する事、それが原因となって Mg-ATPase の低下を引き起こす事を述べているが、分子

レベルでの原因については言及していない。本研究でその原因はミオシンが rod 部分で凝集オリゴマーを形成するためである事を明らかにした。すなわち、rod 部分でこのオリゴマーが形成されるために rod の機能（フィラメント形成能）が失われ、低イオン強度下で不規則な凝集物となり、それが原因となってミオシン頭部とアクチンとの相互作用ができなくなり Mg-ATPase 活性の低下を引き起こしていると思われた。凝集してオリゴマーとなったミオシンのアクチン活性化 Mg-ATPase 活性は単量体のミオシンのものに比べてかなり低いこと、しかもこの凝集体の形成の時間的経過と加熱初期の Mg-ATPase の急激な低下はほぼ対応する事からも支持された。

凝集オリゴマーミオシンを HMM/LMM junction でキモトリプシン消化すると、HMM の凝集体が検出されたのに対し、LMM の凝集体は認められなかった。しかも HMM 凝集画分に ATPase 活性が検出され、ミオシンの ATPase 活性を保持したままの凝集体と本質的に同じであったので、凝集は rod の中でも特に S-2 が関与していると結論した。ただし、この部位での凝集は単離 rod では起こらず、単理 HMM でも起こり難かったので、ミオシン分子で顕著に起こる構造変化である事を認めた。

なお、ATPase 活性が失活したようなミオシンではミオシン頭部（S-1）間での凝集が起きる事は想像され、本研究で扱ったオリゴマーミオシン中にも S-1 部分で凝集したものが混在していると思われた。しかし、本研究で凝集部位特定のため用いたキモトリプシン消化法では、失活した S-1 部分は小断片化されてしまうため、S-1 間の凝集の関与の程度については検出できなかった。

本来ミオシンは硫安飽和度 40~50 % に沈澱する性質があり、これを利用してミオシンを精製する事ができるが、凝集したミオシンは、40 % 飽和硫安で沈澱す

るようになる事を見いだした。また、低イオン強度下でキモトリブシン消化すると、凝集オリゴマーミオシンからは rod' と称した分子サイズが 10 kDa 程長い rod を生成していた。この断片はミオシンの C 末端部分を持った rod であると推定され、生成した全ての rod' は凝集体として存在していた。そのためオリゴマーミオシンが低イオン強度下で形成する凝集物から生成する断片であると思われる、rod' の生成もミオシンの凝集の目安となる事が判った。しかし、rod' を長時間消化し続けると rod (おそらくオリゴマー rod) へと移って行くため、rod' の生成量を定量することは難しく、定量的な指標とする事は不可能であった。今後はこれらの方法を改良するか、もしくは別の方法で凝集反応を定量的に捉える必要があると思われた。また、ミオシンが凝集オリゴマーを形成すると、KCl に対する溶解性が低下し、加熱ミオシンでは溶解に必要な KCl 濃度が上昇する事を見いだしている。これは既に室塚ら (1976) が、マグロミオシンの冷凍変性に使用した手法であるが、これもひとつの検出手段であった。

S-1 部分の変性速度すなわち Ca-ATPase 活性の失活速度は魚種間で差があり、生息水温に依存する事が知られている (橋本、新井、1985; 木村ら、1977 a)。本論文で見いだした rod 部分での凝集も魚種間で差がある事が推測されるが、その検討は凝集速度の解析法の開発を待たねばならない。また、ミオシンの S-1 変性と rod 凝集の速度を比較する事も重要と思われるが、これも凝集速度の解析が必須であり、本論文では明らかにはできなかった。

これらミオシンの凝集反応は加熱だけでなく、氷冷下での貯蔵中에서도起こる事を認めた。また、これがアクチンと結合し、フィラメント形成している筋原線維内のミオシンでも起こる反応かどうかは、魚肉の保蔵、加工の上からも興味深い点であるのでコイ筋原線維を用いて検討した。その結果 Ca-ATPase の失活よりも

先に硫安分画 40~55 % に回収されるミオシン量が減少する事（小関ら、1991）、更に筋原線維のキモトリプシン消化物中に rod' が生成している事から、筋原線維中でも充分起こり得る反応と思われた。また、スケトウダラ及びスケトウダラ冷凍すり身の筋原線維から rod を調製しようとしたところ、筋原線維のキモトリプシン消化物の SDS-PAGE からは充分量の S-1 と rod が生成しているにも関わらず、硫安分画（40~50 %）で rod を集めようとしたが、ほとんどが 40 % 飽和度で沈澱してしまう事を経験している。しかし、この筋原線維から LMM は調製できた。このことから考えて、この筋原線維中で rod は凝集オリゴマーとなっている事、しかも LMM よりも S-2 部分の方が構造変化している事が推測された。これらの事から、ミオシンの凝集反応は筋原線維中でも、冷凍すり身中でも起こり、魚肉の貯蔵中でも充分に起こり得る反応であると思われた。

参考文献

- 安藤 恵子、香川 弘昭 (1991) 細胞工学、10, 687-694
- Atkinson, S.T. & Stewart, M. (1991) *J. Cell Sci.*, 14, 7-10
- Bartels, E.M., Cooke, P.H., Elliott, G.F. & Hughes, R.A. (1984)  
*Proc. Physical. Soc.*, 358, 86P
- Bennett, P.M. (1981) *J. Mol. Biol.* 146, 201-221
- Borejdo, J. & Werber, M.M. (1982) *Biochemistry*, 21, 549-555
- Cheung, H.C. & Morales, M.F. (1969) *Biochemistry*, 8, 2177-2182
- Chiano, Y.C. & Harrington, W.F. (1979) *Biochemistry*, 18, 959-963
- Choe, I., Morita, J., Yamamoto, K., Samejima, K., & Yasui, T. (1991)  
*J. Food Sci.*, 56, 884-890
- Chowrashi, P.K. & Pepe, F.A. (1977) *J. Cell Biol.*, 74, 136-152
- Chowrashi, P.K. & Pepe, F.A. (1986) *J. Musc. Res. Cell Motility*, 7, 413-  
420
- Chowrashi, P.K. & Pepe, F.A. (1989) *Biochimica et Biophysica Acta*, 997,  
182-187
- Cross, R.A. & Vandekerckhove, J. (1986) *FEBS Lett.*, 200, 355-360
- Duke, J.A., Mckay, R., & Botts, J. (1966) *Biochim. Biophys. Acta.*, 126,  
600-603
- Eisenberg, E. & Moos, C. (1970) *J. Bio. Chem.*, 245, 2451-2456

- Elizinga, M. & Trus, B.L. (1980) *Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis*, 213-224
- Genjo-Ando, K. & Kagawa, H. (1991) *J. Mol. Biol.*, 219, 429-441
- Godfrey, J.E. & Harrington, W.F. (1970 a) *Biochemistry*, 9, 886-893
- Godfrey, J.E. & Harrington, W.F. (1970 b) *Biochemistry*, 9, 895
- Gomori, G. (1942) *J. Lab. Clin. Med.*, 27, 955-960
- Gornall, A.G., Bardwill, C.T., & David, M.M. (1949) *J. Biol. Chem.*, 177, 751-766
- Greenfield, N. & Fasman, G.D. (1969) *Biochemistry*, 8, 4108
- Hamai, M. & Konno, K. (1990) *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B, 255-259
- Hamai, M., Yamada-Orito, M., & Konno, K. (1991) *Nippon Suisan Gakkeishi*, 57, 747-753
- 浜井 昌志、吉岡 武也、今野 久仁彦、新井 健一 (1989) 日水誌、55, 1283-1288
- Harafuji, H. & Ogawa, Y. (1980) *J. Biochem.*, 87, 1305-1312
- Harrington, W.F. & Hmelfarb, S. (1972) *Biochemistry*, 11, 2945-2952
- 橋本 昭彦、新井 健一 (1985) 日水誌、51, 99-105
- Huxley, H.E. (1963) *J. Mol. Bio.* 7, 281-308
- 碓谷 敏紀、木村 郁夫、新井 健一 (1981) 日水誌、47, 947-955
- Itzhaki, R.F. & Gill, D.M. (1964) *Anal. Biochem.*, 9, 401
- Kamiya, S., Yoshitomi, B., Konno, K., & Watanabe, S. (1985) *J. Biochem.*, 98, 149-156

- Katoh, N., Nozaki, T., Komatu, K., & Arai, K. (1979)  
*Nippon Suisan Gakkaishi*, 45, 1027-1032
- 加藤 登、内山 均、塚本 志郎、新井 健一 (1977) 日水誌、43, 857-867
- 加藤 早苗、今野 久仁彦 (1990) 日水誌、56, 1877-1883
- Katsura, I. & Noda, H. (1973) *J. Biochem.*, 73, 257-268
- Kimura, I., Arai, K., Takahashi, K., & Watanabe, S. (1980) *J. Biochem.*,  
 88, 1703-1713
- King, L. & Lehrer, S.S. (1989) *Biochemistry*, 28, 3498-3502
- 木村 郁夫、室塚 剛志、新井 健一 (1977 a) 日水誌、43, 315-321
- 木村 郁夫、室塚 剛志、新井 健一 (1977 b) 日水誌、43, 795-803
- King, L. & Lehrer, S.S. (1989) *Biochemistry*, 28, 3498-3502
- 今野 久仁彦、加藤 早苗、江湖 正育 (1990) 日水誌、56, 1885-1890
- 小関 宏明、加藤 早苗、今野 久仁彦 (1993) 日水誌、59, 513-518
- Laemmli, U.K. & Farve, M. (1973) *J. Mol. Biol.*, 80, 579-599
- Lowey, S., Goldstein, L., Cohen, C. & Luck, S.M. (1967) *J. Mol. Biol.*,  
 23, 287-304
- Lowry, O.H., Rowebrough, N.J., Farr, A.L., & Randall, R.J. (1951)  
*J. Biol. Chem.*, 193, 265
- Maeda, K., Sczakiel, G., & Wittinghofer, A. (1987) *Eur. J. Biochem.* 167,  
 97-102
- Maita, T., Yajima, E., Nagata, S., Miyanishi, T., Nakayama, S. &  
 Matsuda, G. (1991) *J. Biochem.*, 110, 75-87
- Makie, I.M. & Connell, J.J. (1964) *Biochim. Biophys. Acta.*, 93, 544-522

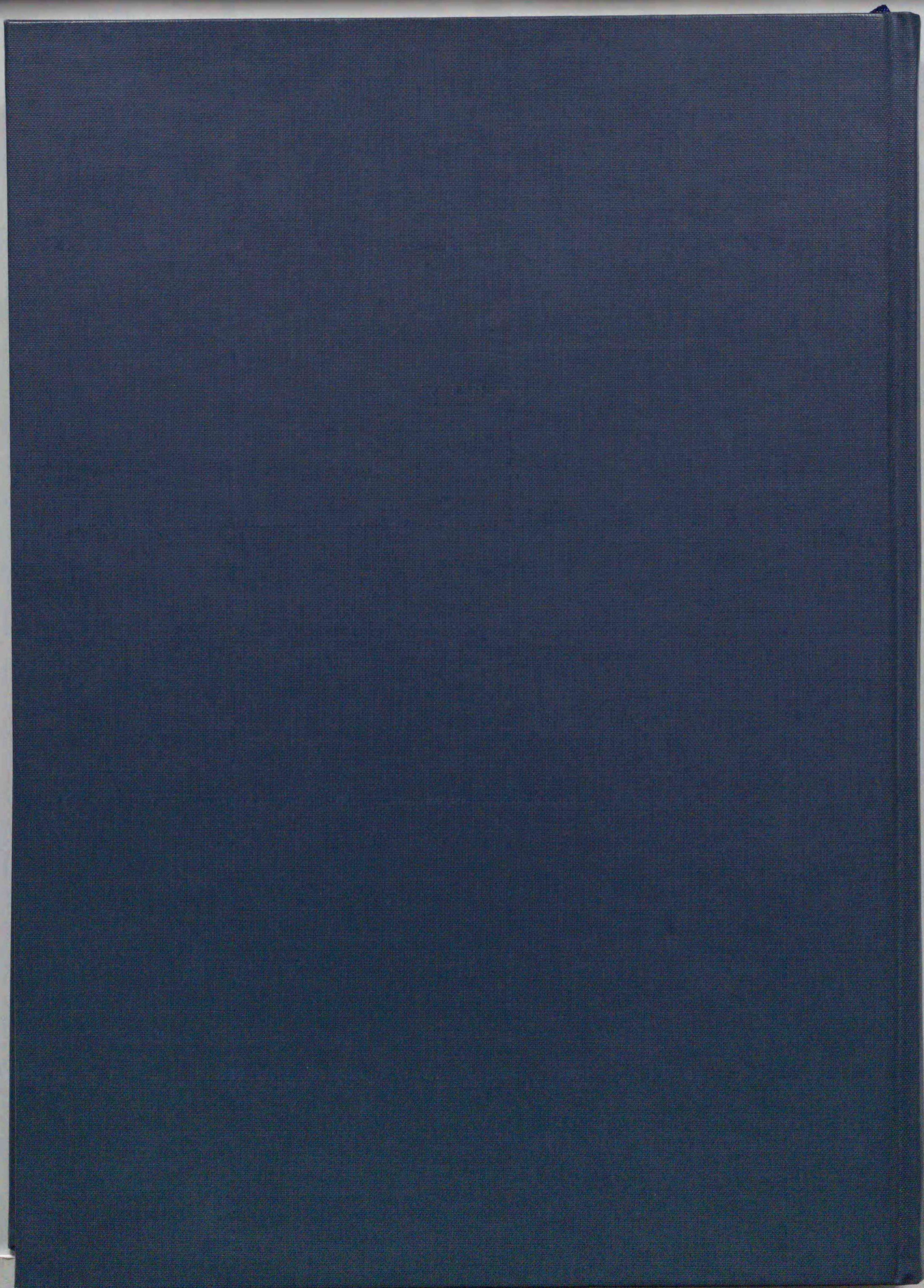
- 松浦 基、新井 健一 (1985) 日水誌、51, 1697-1704
- 松浦 基、新井 健一 (1987) 日水誌、53, 1073-1082
- McLachlan, A.D. & Karn, J. (1982) *Nature*, 299, 226-231
- Mejillano, M.R. & Himes, R.H. (1991) *J. Biol. Chem.*, 226, 657-664
- Morita, J., Choe, I., Yamamoto, K., Samejima, K., & Yasui, T. (1987)  
*Agric. Biol. Chem.*, 51, 2895
- 室塚 剛志、新井 健一 (1976) 日水誌、4, 163-169
- 室塚 剛志、高志 令二、新井 健一 (1976) 日水誌、42, 57-63
- Niwa, E., Kanoh, S., Osaka, Y., Nakayama, T., Watabe, S., &  
Hashimoto, K. (1989) *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 143-146
- 丹羽 栄二、中山 照雄、浜田 巖 (1985) 日水誌、51, 855
- Nyitray, L., Mocz, G., Szilagyi, L. & Balint, M. (1983) *J. Biol. Chem.*,  
258, 13213-13220
- Persechini, A. & Rowe, A. (1984) *J. Mol. Biol.* 172, 23-39
- Presron, C. & Seibert, M. (1991) *Biochemistry*, 30, 9615-9624
- Reisler, E., Liu, J. & Cheung, P. (1983) *Biochemistry*, 22, 4954-4960
- Reisler, E. & Liu, J. (1982) *J. Mol. Biol.*, 157, 659-669
- Rodgers, M.E. & Harrington, W.F. (1987) *Biochemistry*, 26, 8697-8703
- Samejima, K., Takahashi, K. & Yasui, T. (1974) *Agr. Biol. Chem.*, 38,  
1049-1059
- Seidel, C.J. (1975) *J. Biol. Chem.*, 250, 5681-5687
- Sent-Györgyi, A.G., Cohen, C., & Philpott, D.D. (1960) *J. Mol. Biol.*, 2,  
133-142

- Sutoh, K. (1983) *Biochemistry*, 22, 1579
- Sutoh, K., Chiano, Y.C., & Harrington, W.E. (1978) *Biochemistry*, 17,  
1234-1239
- 田中 晴夫、木村 郁夫、新井 健一 (1982) 日水誌、48, 445-453
- Tashiro, Y., Kumon, A., Yasuda, S., Murakami, N. & Matsumura, S. (1985)  
*J. Biochem.*, 14, 521-528
- Trus, B.L. & Elizinga, M. (1981) *In Structural Aspects of Recognition  
and Assembly in Biological Macromolecules*, 1, p31,  
Int. Science Services, Boston.
- Ueno, H. & Harrington, W.F. (1986 a) *J. Mol. Biol.*, 190, 59-68
- Ueno, H. & Harrington, W.F. (1986 b) *J. Mol. Biol.*, 190, 69-82
- Ueno, H. & Rogers, M.E. & Harrington, W.F. (1983) *Biophys. J.*, 41, 2309
- Walker, M., Knight, P., & Trinick, J. (1985) *J. Mol. Biol.*, 184, 535-542
- Weed, A.G & Pope, B. (1977) *J. Mol. Biol.*, 111, 129-157
- Wicker, L. & Knopp, J.A. (1988) *Arch. Biochem. Biophys.*, 266, 452-461
- Woods, E.F. (1967) *J. Biol. Chem.*, 242, 2859-2871
- Yagi, N. & Offer, G.W. (1981) *J. Mol. Biol.* 151, 467-490
- Yamamoto, K., Hayashi, S., & Yasui, T. (1993) *Biosci. Biotech. Biochem.*,  
57, 383-389
- Yamamoto, K. (1990) *J. Biochem.* 108, 896-898
- 山本 康博、碓谷 敏紀、今野 久仁彦、新井 健一 (1989) 日水誌、55,  
727-732

## 謝 辞

本論文を作成するに当たり、有益なる御指導、御校閲の労を賜った 北海道大学水産学部教授 関 伸夫 博士、酪農学園大学教授 安井 勉 博士、北海道大学水産学部教授 西田 清義 博士 並びに 北海道大学水産学部助教授 今野 久仁彦 博士 に深く感謝し、厚く御礼申し上げます。また、本研究の遂行に際し、終始有益なる御指導、御討論を賜った 前同学部教授新井 健一 博士 並びに 北海道大学農学部教授 高橋 興威 博士 に心から感謝いたします。

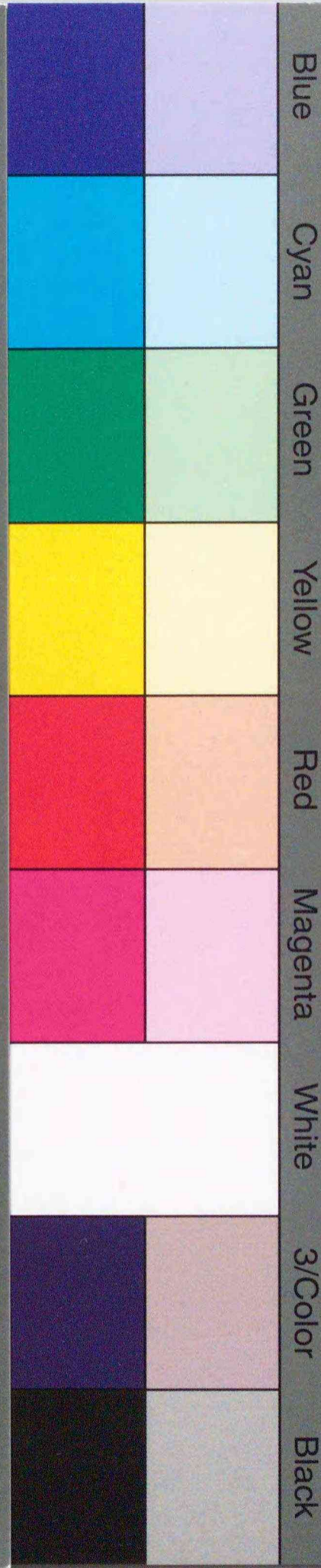
アミノ酸分析に御協力頂いた 北海道大学機器分析センターに感謝いたします。また、電子顕微鏡の諸操作法を御指導頂いた 本学部微生物学講座 大迫 典久 博士、及び本実験に御協力頂いた 小関 宏明 氏に深く感謝いたします。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

